

Papel de la serina/treonina quinasa  
*altered disjunction (ald)* en la regulación de la  
integridad epitelial y progresión tumoral.

MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA  
BEATRIZ PÉREZ SAN JUAN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS

**DIRECTOR DE LA TESIS:**  
**Dr. ANTONIO BAONZA CUENCA**

**TUTOR:**  
**Dr. JOSÉ FELIX DE CELIS IBEAS**

**BEATRIZ PÉREZ SAN JUAN**  
**MAYO 2013**





**Este trabajo ha sido realizado en el  
Departamento de Biología Molecular;  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
(C.S.I.C – U.A.M)**






## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	10
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	13
<b>1.- Introducción.</b>	15
<b>2.- <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.</b>	16
2.1.- Ciclo de vida y desarrollo de <i>Drosophila melanogaster</i> .	17
2.2.- El disco imaginal de ojo como modelo para la búsqueda y análisis de genes requeridos para el control de la proliferación y/o diferenciación.	18
2.2.1.- Regulación espacial y temporal de la determinación neuronal	19
2.2.2.- Regulación espacial y temporal de la proliferación.	20
<b>3.- ¿Por qué una búsqueda de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular basada en el fenotipo de ganancia de función?</b>	21
<b>4.- Establecimiento y mantenimiento de las características de un Epitelio: Visión General.</b>	22
4.1.- Formación de las Uniones Adherentes.	23
4.2.- Regulación de la estabilidad de las Uniones adherentes vía Rho GTPasas y conexión con Polaridad.	24
4.3.- Establecimiento de la Polaridad apico-basal.	24
4.4.- Polaridad apico-basal y Rho GTPasas : Regulación recíproca.	25
<b>5.- Morfogénesis del disco imaginal de ojo-antena y de la retina pupal.</b>	26
5.1.- Adhesión celular, polaridad celular planar (PCP) y polaridad apico-basal en el desarrollo del disco imaginal de tercer estadio larvario.	26
5.2.- Morfogénesis de la retina pupal, como modelo para estudiar la reorganización celular dentro de un epitelio.	28
<b>6.- Pérdida de integridad epitelial y cáncer.</b>	29
<b>7.- Muerte celular inducida.</b>	30
7.1.- Cascada Apoptótica.	30
7.2.- Vía de la C-Jun N-terminal quinasa (JNK).	31
8.- Mecanismos de reparación de daños en el ADN.	32
9.- Antecedentes del gen seleccionado para su caracterización funcional ( <i>ald/mps1</i> ).	34
<b>II. OBJETIVOS.</b>	37
<b>III. MATERIAL Y METODOS.</b>	39
<b>1.- Cultivo de <i>Drosophila</i>.</b>	41
1.1.- Ensayo de estrés metabólico.	41
<b>2.- Estirpes de <i>Drosophila</i>.</b>	42
<b>3.- Sistema de detección de la actividad de Rho1.</b>	43
<b>4.- Inactivación ectópica de genes: silenciamiento con cepas UAS ARNi</b>	43
<b>5.- Sistemas utilizados para el análisis clonal.</b>	43
5.1.- Inducción de clones mediante el sistema FLP/OUT.	43
5.2.- Sistema de recombinación basado en secuencias FRT.	43

<b>6.- Métodos de Bioquímica y Biología molecular.</b>	44
6.1.- Ensayos de co-inmunoprecipitación.	44
6.2.- Detección de los niveles de fosforilación de Sqh mediante “Western-blot”	44
6.3.- Generación de líneas UAS y de expresión en células S2.	44
6.4.- Mutagénesis dirigida.	44
6.5.- Inducción y purificación de la proteína de fusión ald-GST-His.	45
6.6.- Generación del anticuerpo específico de ald.	45
<b>7.- Tinciones Histológicas e Inmunohistoquímicas.</b>	45
7.1.- Ensayo de detección de Fase S del ciclo (Edu).	45
7.2.- Ensayo de detección de la forma fosforilada de Moesina (P-Moe).	45
7.3.- Ensayo de detección de muerte celular: TUNEL.	46
<b>8.- Preparación de muestras para su análisis por Microscopía electronica</b>	46
<b>9.- Métodos de microscopía y procesado de imágenes.</b>	46
9.1.- Microscopía óptica..	47
9.2.- Microscopía confocal.	47
9.3.- Procesado de imágenes.	47
<b>IV. RESULTADOS.</b>	49
<b>1.- Búsqueda de genes involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación neuronal.</b>	51
1.1.- Análisis de los fenotipos de ojo adulto.	51
1.2.- Análisis del patrón de división y diferenciación en el disco imaginal de ojo de tercer estadio larvario.	53
1.3.- Selección de genes para el análisis monográfico.	54
<b>2. Identificación del gen responsable del fenotipo de sobreexpresión de la línea EP-M50.2.</b>	54
3. Caracterización fenotípica y funcional del gen <i>altered disjunction (ald)</i> .	57
3.1.- Patrón de expresión de Ald durante el desarrollo.	57
3.2.- Caracterización fenotípica de la falta de función de <i>ald</i> durante el desarrollo del ojo y ala.	60
3.2.1.- Descripción de los alelos utilizados.	60
3.2.2.- Descripción del fenotipo generado por la expresión del ARN-i de <i>ald</i> .	61
3.2.3.- Análisis fenotípico de la falta de función de <i>ald</i> durante el desarrollo de ojoFR	61
3.2.3.1.-Ojo adulto.	61
3.2.3.2.- Disco imaginal de ojo (3er estadio larvario).	64
3.2.3.3.- Desarrollo de la retina en estadios pupales.	68
3.2.4.- Análisis fenotípico de la falta de función de <i>ald</i> durante el desarrollo del ala	70
3.2.4.1.- Ala adulta	70
3.2.4.2.- Disco imaginal de ala.	71

3.2.5.- Defectos fisiológicos.	77
3.2.6.- Efecto de la contribución materna.	77
3.3.- Caracterización fenotípica de los efectos producidos por la sobre-expresión de <i>ald</i> durante el desarrollo del ojo.	77
3.3.1.- Efecto de la sobre-expresión de <i>ald</i> en el control de la proliferación celular.	77
3.3.2.- Papel de <i>ald</i> en la regulación de la viabilidad celular, motilidad e integridad epitelial.	81
3.3.3.- La sobre-expresión de <i>ald</i> induce una transición-epitelio mesénquima	86
3.3.4.- Análisis clonal.	89
<b>4.- Función de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial.</b>	91
4.1.- Interacciones genéticas entre <i>ald</i> y distintos genes requeridos para el establecimiento y/o mantenimiento de la integridad epitelial.	91
4.2.- Papel de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial en el disco imaginal de ala: Moe-Rho	92
4.3.- Otras posibles rutas de interacción con Ald: LKB1/sqh.	96
4.4.- Establecimiento del modelo de estudio de la transición epitelio-mesénquima (TEM) ocasionada por la activación de <i>ald</i> : Ensayo de movilidad.	101
<b>5.- Ensayos de cooperación tumoral.</b>	105
5.1.- Ensayo de cooperación tumoral con la ganancia de función: Interacción Ald/EGFR-Notch.	105
5.2.- Ensayo de cooperación tumoral con la falta de función. Interacción: <i>ald/lgl</i> .	107
<b>6.- Regulación de los niveles de Ald a través de la ruta del EGFR</b>	110
<b>7.- Función de <i>ald</i> en el control de la muerte celular.</b>	112
<b>8.- Recombinación mitótica.</b>	114
8.1.- Inducción de recombinación mitótica en condiciones de falta de función de <i>ald</i> .	114
8.2.- Inducción de recombinación mitótica en condiciones de falta de función de la vía EGFR.	116
8.3.- Posible mecanismo de acción, <i>spindle A (spn-A)</i> .	116
8.4.- Estudio de la posible implicación del incremento de recombinación mitótica en el desarrollo tumoral.	118
<b>V. DISCUSIÓN</b>	121
<b>1.-Análisis de la búsqueda de genes involucrados en la regulación de proliferación y diferenciación celular.</b>	123
<b>2.- El CG7643 es el responsable del fenotipo de sobre-expresión de línea EP- M50.2.</b>	124
<b>3.- Antecedentes del CG-7643 y su efecto sobre proliferación.</b>	124
<b>4.- Efecto de la desregulación de <i>ald</i> sobre integridad epitelial.</b>	125
<b>5.- Efectores a través de los cuales <i>ald</i> ejerce su función en la regulación de la integridad epitelial.</b>	127
5.1.- Moe y Rho como efectores de la función de <i>ald</i> .	127
5.2.- Relación entre <i>ald</i> y LKB1.	128

5.3.- Otros posible efectores de la función de <i>ald</i> en el mantenimiento de la integridad epitelial.	128
<b>6.- Utilidad del Ensayo de Movilidad</b>	130
<b>7.- Inducción de muerte celular.</b>	130
<b>8.- Papel de <i>ald</i> como inhibidor de Recombinación Mitótica, su relación con la vía del EGFR y posibles mecanismos a través de los cuales <i>ald</i> ejerce esta función.</b>	131
8.1.- Ald/EGFR y recombinación mitótica.	131
8.2.- ¿Cómo puede estar mediando este efecto <i>ald</i> ?	132
8.2.2.-Reguladores del proceso de recombinación mitótica.	132
8.2.3.- LKB1.	133
<b>9.- Papel de <i>ald</i> en la progresión tumoral.</b>	134
 <b>VI. CONCLUSIONES</b>	139
 <b>VII. RESUMEN</b>	143
 <b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	147



## ABREVIATURAS

• > UAS	“Upstream Activating Sequence”
• °C	Grado centígrado
• A	Anterior
• <i>ald</i>	<i>altered disjunction</i>
• ADN	Ácido desoxirribonucleico
• AEL	“After Egg Laying”
• Arm	Armadillo
• DE-cad	DE-cadherina
• DFP	Después de la Formación del Pupario
• ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
• BSA	Seroalbúmina bovina
• <i>bsk</i>	<i>basket</i>
• Casp-3	Caspasa 3 activada
• cols.	Colaboradores
• Da-PKC	<i>Drosophila</i> atypical protein kinase-C
• Dl	Delta
• Dlg	Disc large
• Dpp	Decapentaplegic
• EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
• EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
• <i>en</i>	<i>engrailed</i>
• EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
• <i>ey</i>	<i>eyless</i>
• FBS	suero fetal bovino
• JNK	Jun N-terminal kinasa
• Flp	Flipasa
• FRT	“Flipase Recombination Target”
• GC	“Gene Conversion”
• GFP	“Green Fluorescent protein”
• h	horas



---

• <i>hep</i>	<i>hemipterus</i>
• <i>hb</i>	<i>hedgehog</i>
• HRP	“horseradish peroxidase”
• hs	“heat-sock”
• N	Notch
• MAPK	“Mitogen Activated Protein Kinase”
• min	minutos
• MKP3	MAPK phosphatase 3
• Mps1	Monopolar spindle 1
• NHEJ	“Non homologous end joining”
• P	Posterior
• PBS	“Phosphate Buffered Saline”
• PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen”
• PCR	“Polimerase Chain Reaction”
• PH3	“Phospho-Histone 3”
• <i>puc</i>	<i>puckered</i>
• <i>rpr</i>	<i>reaper</i>
• RH	Recombinación Homóloga
• <i>sal</i>	<i>spalt</i>
• <i>scrib</i>	<i>scribble</i>
• Ser	Serina
• SM	Surco Morfogenético
• SSA	“Single Strand Annealing”
• stg	string
• Thr	“Threonin”
• <i>tub</i>	<i>tubulina</i>
• TUNEL	“TdT-mediated dUTP nick end-labelling”
• Tyr	“Tyrosin”
• V	Ventral
• <i>w</i>	<i>white</i>
• <i>wg</i>	<i>wingless</i>
• <i>y</i>	<i>yellow</i>



# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1.- INTRODUCCIÓN.

Reza el refrán que más vale solo que mal acompañado. Aunque no es menos cierto que mejor bien acompañado que solo. Muy posiblemente, estas máximas estuvieron presentes hace más de 600 millones de años cuando tuvo lugar uno de los mayores logros de la evolución, el tránsito hacia la pluricelularidad. Existen varias teorías acerca de cómo se medió dicha transición, unas apoyan a la comunicación intercelular como la base del proceso, otras a mutaciones que impidieron a las células separarse tras la división (mitosis), aunque estas teorías aún son cuestión de debate. Lo que sí parece estar claro es que la agrupación y la diferenciación celular (división del trabajo entre los distintos tipos de células que conforman un organismo) reportan beneficios para el sistema. Esta especialización funcional ha permitido el desarrollo de estructuras tan complejas y apasionantes como el sistema nervioso, o ha dado lugar a la formación de los gametos, que a diferencia del resto de células del organismo (células somáticas), son capaces de transmitir la información genética y dar lugar a nuevos organismos. Pero cómo se alcanza dicha diversidad partiendo de la misma información genética ha sido un problema difícil de responder durante mucho tiempo. Hoy en día, sabemos que la regulación diferencial de la información genética da cuenta de las peculiaridades de las células en cuanto a morfología, supervivencia, ratio de proliferación, etc. Así mismo, las diferencias existentes entre organismos radican en el material genético presente en el núcleo de sus células, cuya divergencia dependerá de los procesos evolutivos que han experimentado de forma independiente.

Los organismos pluricelulares se originan por un proceso relativamente lento de cambios progresivos que ha sido denominado desarrollo. Durante el desarrollo, la célula huevo o cigoto comienza un proceso de división, que continúa de manera coordinada con los procesos morfogenéticos y de especificación celular que van a determinar la forma y la función de los distintos órganos

que constituyen un organismo. Estos procesos están regulados genéticamente, de manera que cada organismo de la misma especie presenta una morfología y un patrón corporal reproducible. Esta coordinación se establece mediante la acción de rutas de comunicación celular que permiten que las células integren las distintas señales de proliferación, diferenciación, crecimiento y/o viabilidad celular. De la integración de estas señales depende el correcto desarrollo del individuo y alteraciones de la actividad de estas rutas están asociadas al desarrollo de distintas patologías (Molnar et al 2010).

Muchos de los mecanismos y genes que operan durante el desarrollo se encuentran conservados entre especies muy alejadas filogenéticamente. Esto ha permitido el uso de diferentes organismos como el ratón (*Mus musculus*), el pollo (*Gallus gallus*) o la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), entre otros, para llevar a cabo diversos estudios y extrapolar los datos obtenidos a la especie humana. Por esta razón, estos organismos se han denominado organismos modelo. Gracias a estos organismos modelo, hemos alcanzado un nivel de conocimiento que no sólo ha permitido entender los procesos que regulan el desarrollo normal, sino la etiología de multitud de enfermedades que de otra forma seguiría siendo desconocida.

En esta tesis hemos realizado una búsqueda de genes necesarios para el control de la proliferación y la diferenciación celular. Para ello hemos utilizado el desarrollo del disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. Esperamos que la identificación de nuevos genes nos ayude a entender cómo se regulan los procesos celulares que determinan el desarrollo de un organismo. Además, alteraciones funcionales de muchos de los genes que afectan a estos dos procesos están asociadas al desarrollo de tumores en humanos. Por esta razón, esperamos que nuestros resultados asienten las bases para establecer modelos moleculares que permitan entender esta patología y puedan ser extrapolados a organismos superiores.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos identificado al gen *altered disjunction (ald)*. Parte de los resultados de esta tesis consisten en la caracterización funcional de este gen. *Ald* codifica para una serina/treonina quinasa, cuya función había sido relacionada con el mantenimiento de la integridad cromosómica. Los resultados de nuestro trabajo han revelado nuevas funciones para esta proteína. Así, proponemos que *Ald* es necesario para mantener la integridad epitelial, la viabilidad celular y para inhibir procesos que dan lugar a recombinación mitótica. Además, de manera directa o indirectamente controla la proliferación celular.

## 2.- *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO ORGANISMO MODELO.

Fueron W. E. Castle (1901) y T. H. Morgan (1909) quienes, a principios del siglo XX, comenzaron a trabajar con *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. Desde entonces se han creado multitud de herramientas y técnicas que, junto a la secuenciación de su genoma, han contribuido al entendimiento de los procesos que operan durante el desarrollo. Cabe destacar que, además del gran volumen de información del que se dispone acerca de este díptero, existen múltiples características que hacen de la mosca del vinagre un modelo de experimentación idóneo. Por un lado, *Drosophila* es fácil de mantener y almacenar, su ciclo de vida es muy corto y da lugar a numerosa progenie. Por otro lado, sólo tiene cuatro pares de cromosomas, no suele presentar los problemas de redundancia genética que existen en los vertebrados y su exoesqueleto proporciona numerosos marcadores morfológicos que permiten seguir modificaciones

genéticas de manera sencilla, lo que facilita en gran medida su uso para distintos abordajes experimentales.

## 2.1.- Ciclo de vida y desarrollo de *Drosophila melanogaster*.

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo que como tal sufre una metamorfosis completa. La duración de su ciclo de vida depende de las condiciones ambientales, siendo la temperatura uno de los factores más relevantes. A una temperatura óptima de 25°C completa su ciclo de vida en 10 días (Fig 1).

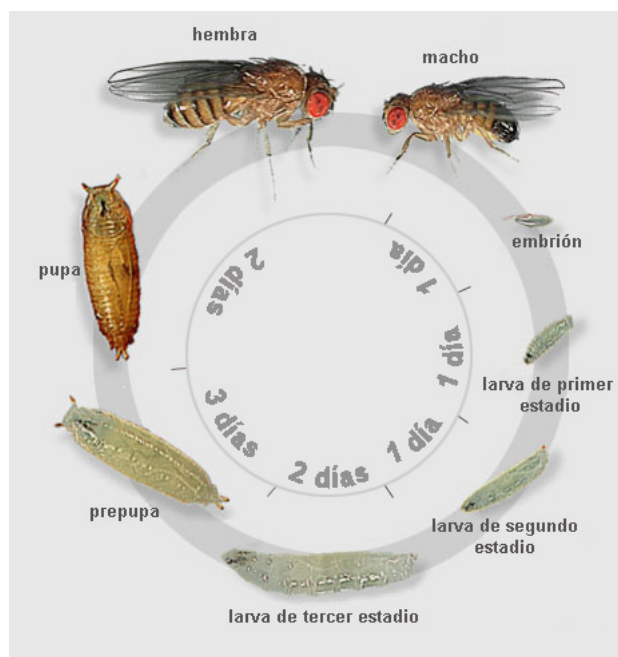


Fig1: Ciclo de vida de *Drosophila* a 25°C. Tomado de Flymove

Tras la puesta del huevo, la embriogénesis ocurre durante las primeras 24 horas del desarrollo, dando paso a la fase larvaria. Esta fase suele durar unos 4 días, a lo largo de los cuales se suceden tres estadios larvarios (LI, LII y LIII). Durante este periodo, en el interior de la larva se desarrollan los discos imaginales (estructuras epiteliales determinadas en el embrión) que darán lugar a la mayoría de los órganos externos de los adultos (García-Bellido and Merriam 1971). Hacia el quinto día de desarrollo, las larvas dejan de alimentarse, se inmovilizan y su epidermis se endurece formando el pupario. Dentro del pupario tiene lugar la metamorfosis, que dura casi 5 días. Durante la metamorfosis, los tejidos larvarios son eliminados por histólisis y reemplazados por los tejidos adultos. Los discos imaginales dan lugar a las estructuras epidérmicas de la cabeza, el tórax, las patas y la genitalia de la mosca, mientras que la epidermis abdominal deriva de los nidos de histoblastos (grupos de células imaginales que proliferan únicamente durante la pupación) (García-Bellido, 1971). Una vez finalizada la metamorfosis, emerge el adulto o imago, que transcurridas unas pocas horas tras la eclosión, alcanza la fertilidad, comenzando así un nuevo ciclo vital. (Fig 2)

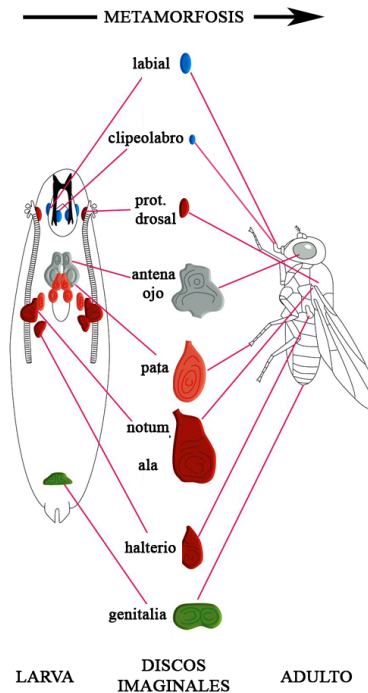


Fig2: Representación esquemática de la localización de los diferentes discos imaginarios en una larva de tercer estadio larvario y su correspondencia con las estructuras a las que darán lugar tras la metamorfosis. (Tomado de Alberts y cols. 2002)

## 2.2.- El disco imaginal de ojo como modelo para la búsqueda y análisis de genes requeridos para el control de la proliferación y/o diferenciación.

El ojo compuesto de *Drosophila* está formado por unos 800 omatidios (Fig 3). Cada uno de estos omatidios o facetas está formado a su vez por 8 fotorreceptores y un número constante de células accesorias. Dentro de cada omatidio los fotorreceptores, denominados R1 al R8, están dispuestos de forma trapezoidal y se encuentran rodeados por células pigmentarias. Sobre los fotorreceptores diferencian unas células denominadas células cono que son las encargadas de secretar la lente, de cada omatidio (Fig 3).

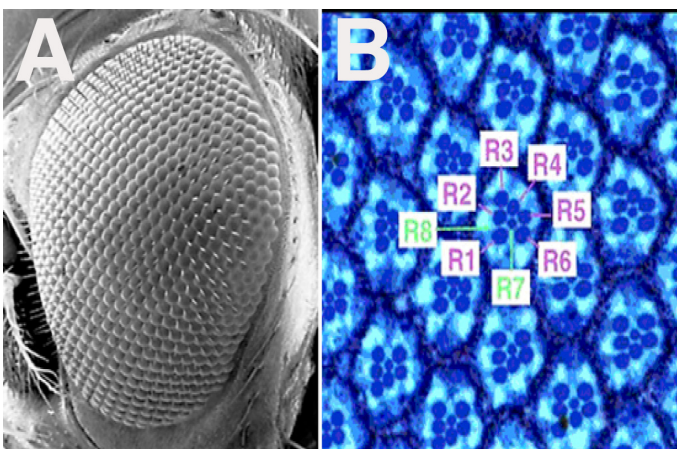


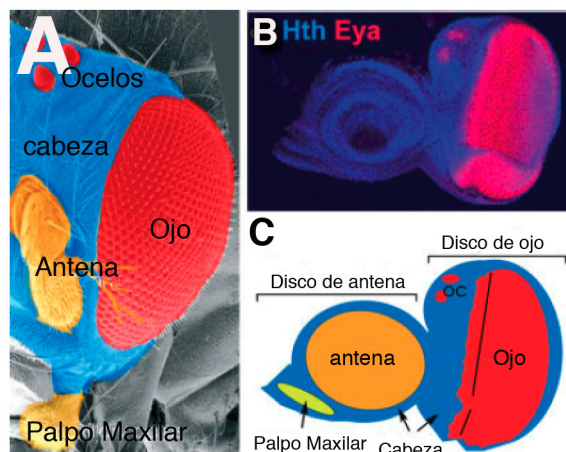
Fig3: Estructura del ojo adulto

(A) Micrografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de un ojo adulto de *Drosophila*. Se pueden apreciar los diferentes omatidios y la organización de los mismos en un ojo WT. (B) Sección ultrafina del ojo adulto. Se aprecia la distribución de los diferentes fotorreceptores dentro de un mismo omatidio. El fotorreceptor R7 se localiza en el mismo punto que el R8 pero a un nivel diferente, por lo que en una visualización apical no se distinguen ambos.



### 2.2.1.- Regulación espacial y temporal de la determinación neuronal.

El desarrollo del ojo comienza durante los estadios larvarios cuando la región que dará lugar a la retina dentro del disco imaginal de ojo-antena se delimita por una cascada jerarquizada de factores de transcripción, destacando los dos homólogos de Pax 6: Twin of eyeless (Toy) y eyeless (ey) (Bonini and Choi 1995) (Fig 4).



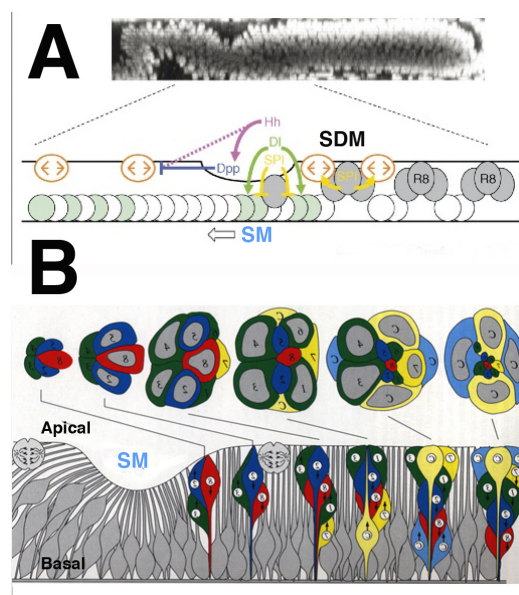
**Fig4: Representación de las estructuras adultas procedentes del disco imaginal de ojo-antena.**

(A) Imagen de la región cefálica de una mosca adulta, donde cada componente (cabeza, ojo y antena) presenta la coloración correspondiente a la región del disco imaginal que lo ha originado. (B) Esta imagen muestra un disco imaginal de ojo-antena subdividido por la expresión de HtH (azul) en regiones que formaran la cabeza, y Eya (rojo) expresado en la región que constituirá el ojo. (C) Esquema del disco imaginal de ojo-antena que se corresponde con la figura A.

Tras la especificación del territorio de ojo, las células comienzan un proceso de división al azar que continúa hasta el inicio del tercer estadio larvario, momento en el que aparece en la parte posterior del ojo una depresión conocida como surco morfogenético (SM) y que atraviesa todo el disco iniciando una ola de diferenciación, así como la sincronización de todas las células en el mismo estadio del ciclo celular (ver más adelante) (Fig. 5A).

**Fig 5: Esquema de la regulación de la proliferación celular y de la diferenciación neuronal tras el paso del surco morfogenético.**

(A) Imagen que muestra en la región superior la sección en el eje z de un disco de tercer estadio larvario, con la zona anterior localizada a la izquierda. Los núcleos están marcados por la expresión de una proteína de fusión (Histona-2-GFP). El disco es un epitelio columnar simple, aunque los núcleos ocupan diferentes posiciones apico-basales. Una ola de diferenciación, la cual avanza a través de la retina desde posterior a anterior, es precedida por el “surco morfogenético” (SM) en el cual las células cambian de forma. La imagen inferior que acompaña al corte es un esquema del epitelio de la retina en las proximidades del SM, resumiendo como las diferentes vías de señalización regulan la proliferación celular y diferenciación neuronal. Las figuras mitóticas aparecen en naranja, los núcleos en fase S en verde claro, hacia la derecha (región posterior) los fotorreceptores (gris) han comenzado la diferenciación. (B) Figura esquemática que muestra el reclutamiento de los diferentes fotorreceptores tras el paso del surco morfogenético (SM) se puede apreciar que la aparición de los distintos FR es progresiva, siendo R8 el primero en diferenciarse, seguido de R2 y R5; R3,R4 y finalmente R6 y R7 por lo que en una visión apical los

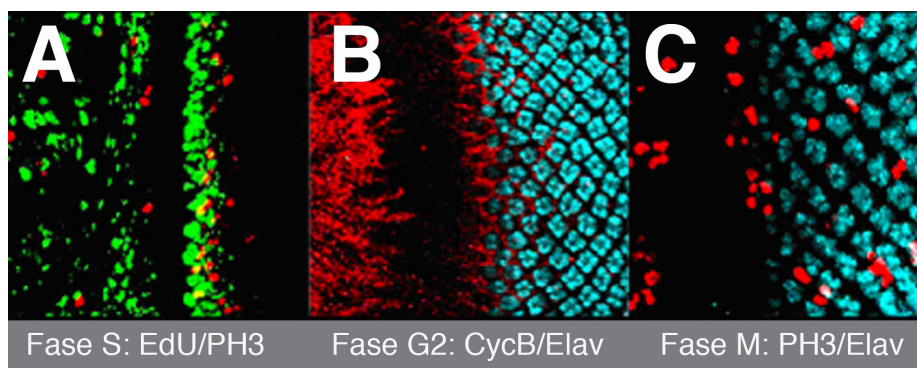


omatismos completos o maduros se encuentran en la región posterior (derecha). Finalmente aparecen también las células cono.

La formación y progreso del SM está dirigido por la ruta de Hedgehog (Hh). Ésta comienza a expresarse en la región posterior del disco, en el lugar donde se origina el surco morfogénico, y continúa expresándose en una banda de células que precede al avance del surco morfogénico y en los fotorreceptores a medida que éstos diferencian (Ready, Hanson et al. 1976; Heberlein, Hariharan et al. 1993; Heberlein and Moses 1995). Según avanza el surco, se produce la determinación neural, que ocurre de manera progresiva y siempre en el mismo orden (Fig. 5). Una de las dianas de Hh es *atonal* (*ato*), que es un gen proneural responsable de la especificación del primer fotorreceptor, R8 (Jarman, Grell et al. 1994; Domínguez 1999). Una vez el fotorreceptor R8 ha sido determinado, se reclutan el resto de los 7 fotorreceptores y 4 células como por cada omatidio (Fig. 5B). El reclutamiento de los receptores depende de la ruta EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), la cual es activada por el ligando Spitz (Freeman 1994; Tio, Ma et al. 1994; Freeman 1996). Otro gen activado por Hh es *decapentaplegic* (*dpp*) que codifica una proteína difusible que hace que las células adopten el estado pre-proneural (células preparadas para el comienzo de la diferenciación) (Fig. 5A).

### 2.2.2.- Regulación espacial y temporal de la proliferación.

Como mencionamos anteriormente, la división de las células en el territorio que dará lugar a la retina es al azar hasta el principio del tercer estadio larvario, momento en el que aparece el surco morfogénico. A medida que el surco avanza y las células entran en él, además de iniciarse el proceso de diferenciación neuronal descrito anteriormente, todas las células se detienen en la fase G1 del ciclo celular, sincronizándose en esa fase del ciclo. Tras el paso del SM se definen grupos de células que continúan paradas en G1 y comienzan a diferenciar como fotorreceptores, mientras que el resto de células que no forman parte de estos grupos, avanzan primero a la fase S, y más tarde a la fase G2 del ciclo (Fig 6).



**Fig 6: Visualización de las distintas fases del ciclo celular en el disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster*, en el tercer estadio larvario.**

Las imágenes A, B y C muestran el marcaje para las distintas fases del ciclo celular en el epitelio del disco. Según avanza el SM las células se detienen en la fase G1; transcurridas de 15 a 20 horas, muchas células entran en la fase S del ciclo y algunas de ellas posteriormente se dividen en la segunda oleada mitótica. Quedan en G1 grupos de cinco células diferenciadas (los fotorreceptores R2, R3, R4, R5 y R8). La incorporación de BrdU ocurre durante la fase S (color verde en la imagen A). La ciclina B comienza su expresión durante la fase G2 y es degradada en mitosis (color rojo en la imagen B). La Histona 3 es fosforilada durante la mitosis (color rojo en la imagen C y A). Elav es un marcador de diferenciación neuronal (azul en B y C).

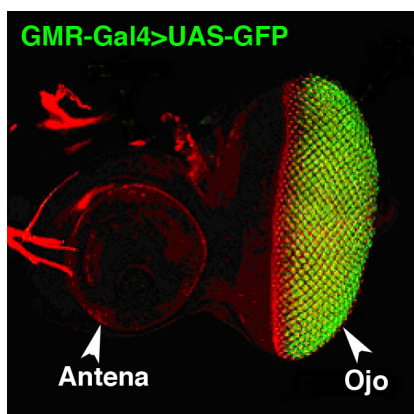
Posteriormente, algunas de estas células reciben una señal de las células adyacentes que están diferenciando y se dividen una vez más. Tras esta división cesa la proliferación. Esta división

coordinada se conoce como segunda división mitótica (SDM) (Wolff and Ready 1993) y está regulada por las señales de la ruta EGFR y Notch. La señalización vía la ruta EGFR en las células paradas en G2 produce la activación transcripcional del homólogo en *Drosophila* de la fosfatasa humana Cdc25, *string*. La presencia de *string* produce la defosforilación parcial del complejo formado por la Ciclina B y la proteína Cdc2, lo que induce el inicio de la mitosis. La activación transcripcional de *string* se produce debido a la represión que la ruta EGFR ejerce sobre el represor transcripcional Ttk69 (que reprime la expresión de *string*), y a la activación del factor transcripcional Pointed, que es fosforilado por la cascada de transducción activada por EGFR. Por otro lado, la ruta de Notch regula la transición G1/S controlando la actividad y expresión del factor E2f y Ciclina A respectivamente (Baker 2001; Baonza and Freeman 2002; Baonza and Freeman 2005).

El hecho de que el disco imaginal ojo se desarrolle de una manera progresiva facilita el que todas las fases del ciclo puedan ser observadas en un solo disco (Fig 6). Además, como las células sólo se dividen una vez en la SDM, es fácil determinar exactamente en qué estadio del ciclo celular ocurre cualquier perturbación que afecte a la división. A su vez, el proceso de diferenciación neuronal también está muy bien definido, tanto espacial como temporalmente, permitiendo la detección de cualquier alteración en el mismo (aumento o disminución de fotorreceptores, fallos de rotación, etc.). Estas características hacen del disco de ojo un modelo idóneo para identificar genes implicados en la regulación de la proliferación celular y diferenciación neuronal.

### 3.- ¿POR QUÉ UNA BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR BASADA EN EL FENOTIPO DE GANANCIA DE FUNCIÓN?

La mayor parte de las búsquedas de genes involucrados en la regulación de la proliferación y la diferenciación neuronal realizadas hasta el momento se han basado en el fenotipo de falta de función de los mismos. Uno de los problemas de este tipo de búsqueda es que aquellos genes cuya función sea redundante con la de otros genes, no serán identificados. Además, muchas de las mutaciones en genes que afectan a la proliferación suelen ser letales embrionarias, lo que hace muy difícil obtener condiciones alélicas lo suficientemente fuertes como para ser identificadas en adultos viables que sean fértiles. Por esta razón, hemos realizado una búsqueda de genes requeridos para el control de la proliferación y diferenciación neuronal basándose en el fenotipo producido por su sobre-expresión.



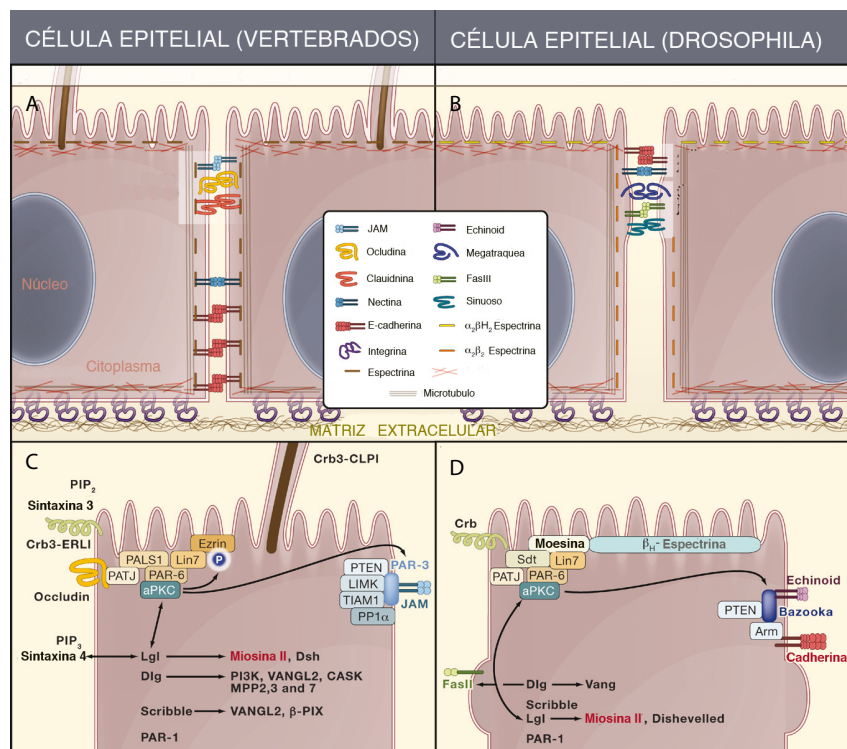
**Fig 7: Dominio de expresión de la línea utilizada en la búsqueda de genes involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación.**

Disco imaginal de ojo-antena en el que se muestra en verde la región en la que se expresa *GMR-Gal4*, en el tercer estadio larvario, que se corresponde con la región que dará lugar al ojo adulto.

Para este estudio, la técnica empleada está basada en el sistema UAS/*Gal4* (Brand and Perrimon 1993), el cual permite la sobre-expresión del gen de interés en un momento concreto del desarrollo y en tejidos específicos. Este tipo de abordaje experimental soluciona los problemas expuestos anteriormente, ya que al buscar genes basándose en su fenotipo de sobre-expresión se evita el problema de redundancia. Además, como la sobre-expresión se realiza sólo en el ojo y las moscas sin ojos son perfectamente fértiles, se elimina el problema de letalidad y fertilidad (Fig7).

#### 4.- ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE UN EPITELIO: VISIÓN GENERAL.

La formación de un epitelio requiere que las células se asocien entre sí mediante el establecimiento de conexiones intercelulares, cuya composición y arquitectura variará dependiendo del contexto celular, así como de la especie. De la misma forma, el correcto establecimiento y mantenimiento de la integridad epitelial requiere que las células adquieran polaridad apico-basal, creándose dominios de membrana segregados espacialmente que presentan diferencias tanto funcionales como estructurales (Fig 8).



**Fig 8: Factores implicados en adhesión celular y polaridad en células epiteliales.**

(A) Representación esquemática de dos células epiteliales típicas de vertebrado. La unión estrecha (UE) se forma por interacción hemofílica entre moléculas de adhesión de la unión (JAM), Occludinas y Claudinas. Las Uniones adherentes (UA), se localizan justo debajo de las UE's y están compuestas por Cadherinas y Nectinas. (B) En las células epiteliales de *Drosophila*, la organización de las uniones es inversa, presentando UA's en la región apical y Uniones Septadas (US's) en la región inferior a estas. Las células polarizadas de *Drosophila* no presentan cilio. (C,D) Esquema de las relaciones existentes entre proteínas de polaridad y los mecanismos que regulan, modulando la estabilidad de las UA's.



#### 4.1.- Formación de las Uniones Adherentes.

Una de las características de un epitelio es la presencia de Uniones Adherentes (UA's) (Fristrom 1988). Las UA's se forman por contactos que tienen lugar entre cadherinas epiteliales (E-cadherina) que se agrupan en regiones definidas de la superficie de células adyacentes. Estas uniones se ven modificadas por la acción de otras moléculas de adhesión, como el complejo Nectina-Afadina, en vertebrados, o Echinoid-Canoe, en *Drosophila melanogaster* (Wei, Escudero et al. 2005); Roeth, Sawyer et al. 2009) para dar lugar a la maduración de las uniones adherentes. El proceso de maduración de las uniones adherentes conlleva la formación de las Uniones Estrechas (UE's), en vertebrados, y de las Uniones Septadas (US's) en *Drosophila*, estructuras que funcionan como barrera que impide la difusión de lípidos y proteínas entre diferentes dominios de membrana de la misma célula. La E-cadherina pertenece a la familia de las moléculas de adhesión tipo cadherinas clásicas, que facilitan la regulación dinámica de las conexiones intercelulares (Gumbiner 1988); Gumbiner et al. 2005). Las moléculas de E-cadherina están formadas por un dominio extracelular, que permite los contactos homofílicos que se establecen con las células adyacentes, y una cola citoplasmática que media la interacción con múltiples efectores. Una de las interacciones mejor caracterizadas es la unión de la cola citoplasmática de la E-cadherina con la beta-catenina (Armadillo en *Drosophila*), que a su vez se asocia con la alfa-catenina. A través de la formación de estos contactos, la E-cadherina es capaz de conectar con el citoesqueleto de actina (Gavard et al. 2004); Haruta, Warrior et al. 2010) y modular su organización en el cortex celular ((Baum and Perrimon 2001; Bolos, Peinado et al. 2003). A su vez, permite que señales generadas por cambios en los contactos intercelulares o estrés mecánico puedan ser transmitidas intracelularmente, induciendo cambios en la expresión génica (Okada, You et al. 2007; Harten, Shukla et al. 2009). De esta forma, los complejos formados por E-cadherina-Catenina resultan indispensables para el correcto funcionamiento del epitelio, ya que, además de mantener las células unidas dentro del epitelio, actúan como sensores de los cambios que tienen lugar a su alrededor.

Una de las características que define a las Uniones Adherentes es que son estructuras dinámicas (Fujita, Krause et al. 2002; Pilot, Philippe et al. 2006; Cavey, Rauzi et al. 2008; de Beco, Gueudry et al. 2009). Cada una de las UA's que conectan las células epiteliales es susceptible de entrar en ciclos constantes de formación y destrucción. Esta característica es fundamental para que se pueda mantener la integridad epitelial mientras tienen lugar los cambios en el empaquetamiento y organización celular necesarios para la formación de los tejidos, la división celular o la eliminación de células dañadas. La regulación de los niveles de E-cadherina presentes en las UA's es dependiente de la endocitosis mediada por clatrina (Baum et al. 2008). Estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, han mostrado que existe reciclaje de E-cadherina desde el dominio basolateral hacia las UA's (Langvein 2005). La endocitosis mediada por Dinamina y Actina elimina la E-cadherina ectópica, regulando la correcta localización, así como la estabilización de las uniones adherentes maduras (Georgiou, Marinari et al. 2008; Leibfried, Fricke et al. 2008). En cambio, para su reciclaje se requiere la acción del complejo de exocitosis, proceso que parece estar mediado a través de la beta-catenina (Langevin, Morgan et al. 2005), sugiriendo que esta proteína puede dirigir la exocitosis de componentes de las UA's a diferentes regiones de la membrana. Por lo tanto, el reciclaje de E-cadherina juega un papel primordial en la regulación del estado de adhesión intercelular.

#### **4.2.- Regulación de la estabilidad de las Uniones adherentes vía Rho GTPasas y conexión con Polaridad.**

Aunque la regulación de la estabilidad de las Uniones Adherentes varía entre los diferentes sistemas de experimentación, la formación y el mantenimiento de estas estructuras suele depender de los mismos procesos (Bowers-Morrow, Ali et al. 2004). Por un lado, como acabamos de explicar, es fundamental la regulación de las interacciones que se dan entre los distintos componentes de las uniones adherentes. Por otro lado, es necesario un estrecho control de la organización del citoesqueleto y de sus principales reguladores, las proteínas de la familia de las pequeñas GTPasas (Rho, Rac y Cdc42) (Braga 2002). Entre estas proteínas y la dinámica de las UA's existe una relación de dependencia bidireccional, de manera que las pequeñas GTPasas contribuyen a la regulación de la estabilidad y localización de las UA's, y estas, a su vez, modifican la actividad de Rho, Cdc42 y Rac, regulando la estructura y polaridad de las células. Esta colaboración entre las Rho GTPasas y la formación de las UA's se mantiene durante la maduración de estas estructuras. De esta forma, RhoA ayuda a mantener la adhesión celular mediada por E-cadherina, a través de Diaphanous1 (Sahai and Marshall 2002) y la Miosina no muscular II (Shewan, Maddugoda et al. 2005), afectando a la estabilidad de las uniones a través de varios mecanismos. Por un lado, promoviendo la adhesión y agrupación de moléculas de E-cadherina, y por otro, manteniendo la integridad del anillo de actina que presentan todas las células en la región apical del cortex (Smutny, Cox et al. 2010). Así mismo, también se ha relacionado la actividad de la señalización de Rho en la desintegración de las UA's que tiene lugar durante la transición epitelio-mesénquima (Takaishi, Sasaki et al. 1994; Bhowmick, Ghiassi et al. 2001).

La interacción existente entre los complejos de polaridad apical y el complejo de polaridad baso-lateral de la célula, determina una región de mutua exclusión que ayuda al correcto posicionamiento de las UA's (Assemat, Bazellieres et al. 2008; Muller and Wieschaus 1996). Una vez que las UA's han sido establecidas, parte de los componentes de los complejos de polaridad apical actúan de manera conjunta con las RhoGTPasas para promover la estabilidad de las uniones. Cabe destacar que estas interacciones son especialmente importantes en tejidos que van a sufrir remodelación. Este efecto es claramente visible durante el desarrollo del ectodermo embrionario de *Drosophila*. En este sistema se pueden comparar las UA's de la región dorsal (estables), con las UA's de la región ventral (inestables), donde un tercio de las células se van a delaminar para la formación de los neuroblastos (células madre neuronales) (Campos-Ortega et al. 1997). Al analizar el fenotipo de embriones mutantes para E-cadherina, se observa que las uniones adherentes y la polaridad celular se mantienen intactas en células de la región dorsal, mientras que en la región ventral tiene lugar una marcada desorganización del epitelio. Este resultado determina que existe un mayor requerimiento de E-cadherina para mantener la estabilidad de las uniones adherentes, así como de la polaridad apico-basal en tejidos en remodelación. Este mismo efecto se observa de manera repetida a lo largo del desarrollo, tanto de *Drosophila* como de otros organismos (Harris and Tepass 2008).

#### **4.3.- Establecimiento de la Polaridad apico-basal.**

El establecimiento de la polaridad apico-basal requiere tres procesos fundamentales. En primer lugar, se tiene que “romper la simetría” de los componentes de la célula (hasta los seres unicelulares más simples, e incluso la célula huevo, presentan asimetrías, aunque éstas no sean apreciables), hecho que normalmente obedece a la acción de señales externas. En segundo lugar, a

través de señales de transducción, se tiene que generar un eje apico-basal, estableciendo una organización espacial y funcional. Finalmente, se produce una amplificación y mantenimiento del estado polarizado mediante bucles de retroalimentación positivos. Una vez establecido el eje apico-basal, una célula polarizada presenta un dominio apical y un dominio baso-lateral. Estos dominios están formados por tres complejos proteicos, cuya composición está ampliamente conservada. El dominio apical se determina por la presencia del complejo proteico de Par, que comprende a Par-3 (Bazooka), Para-6 y la proteína quinasa atípica C (a-PKC), y del complejo proteico de Crumbs (Crb), el cual incluye a Crumbs, la proteína de las uniones estrechas asociada a Pals-1 (Patj) y a Stardust (Sdt). El dominio baso-lateral únicamente presenta el complejo de determinantes baso-laterales, compuesto por Scribble (Sb), Disc-large (Dlg) y Lethal giant larvae (Lgl) (revisado en (McCaffrey and Macara, 2012).

El proceso de ruptura de la asimetría requiere de una señal inicial de polarización, normalmente la activación de Cdc42, que se ve reforzada por el reclutamiento de proteínas estabilizadoras (Tong, Gao et al. 2007; Charest and Firtel 2007) y la inhibición de la difusión de esta proteína (Xiong, Huang et al. 2010). Posteriormente, es necesaria la distribución de manera segregada de las proteínas de los diferentes complejos de polaridad. Para generar el patrón específico de estas proteínas, se requiere la participación de múltiples mecanismos, como el transporte, llegada y anclaje a membrana, y la exclusión activa de otras zonas de la célula. El transporte puede significar difusión pasiva o movilización dirigida a través del citoesqueleto. El anclaje es mediado por interacciones con fosfolípidos (Krahn, Buckers et al. 2010; Wu, Feng et al. 2007), elementos del citoesqueleto, o complejos proteicos específicos (Ebnet, Schulz et al. 2000; Itoh, Sasaki et al. 2001; Takekuni, Ikeda et al. 2003), y es el responsable de que la gran mayoría de proteínas de polaridad, salvo contadas excepciones (Par4 y Par5), se encuentran predominantemente en la región del cortex. A su vez, dado que ninguno de los mecanismos mencionados hasta ahora anclan de manera estable estas proteínas a la membrana y teniendo en cuenta que presentan un reciclaje constante, e incluso son capaces de difundir lateralmente (Goehring, Hoege et al. 2011), es necesaria la existencia de mecanismos adicionales para definir y mantener su distribución polarizada. Estos mecanismos adicionales suelen involucrar reacciones cruzadas de fosforilación (Benton and St Johnston 2003; Hurd, Fan et al. 2003, Hurov, Watkins et al. 2004; Betschinger, Mechtler et al. 2003), que en último término eliminan la presencia de las proteínas en la membrana mediante inhibición de la interacción con la proteínas de anclaje, secuestro en el citoplasma, etc. Estos mecanismos presentan un nivel de complejidad muy elevado, y cabe destacar que, a pesar del alto grado de conservación a nivel de secuencia, la regulación y reacciones cruzadas que tienen lugar entre los distintos componentes de los complejos de polaridad y otros componentes de señalización, varían de un contexto a otro y de una especie a otra.

#### **4.4.- Polaridad apico-basal y Rho GTPasas : Regulación reciproca.**

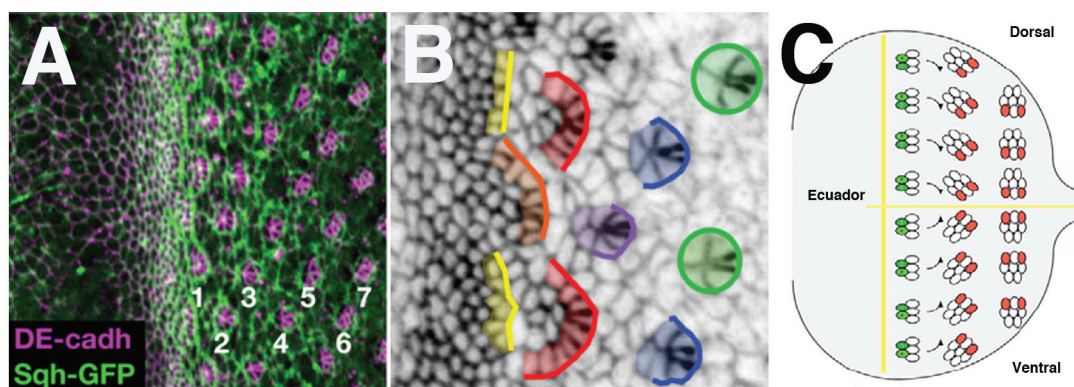
Los filamentos de actina y los microtúbulos son dos de los principales componentes que presentan asimetría en su distribución dentro de las células. Ambos son polímeros vectoriales que participan en el transporte de diferentes moléculas intracelulares. Por lo tanto, su organización es vital para la polarización celular. Esta organización es dinámica y altamente regulada. La regulación se lleva a cabo a través de señales externas e internas, señales que suelen involucrar la actividad de miembros de la familia de las pequeñas RhoGTPasas. A su vez, estas proteínas regulan y son reguladas por proteínas de polaridad. En *Drosophila* se ha visto que Cdc42 es capaz de modificar las

interacciones de mutua exclusión que existen entre distintas proteínas del complejo Par (Garrard, Capaldo et al. 2003; Yamanaka, Horikoshi et al. 2001). A su vez, también puede reclutarlas de manera directa a la membrana (Atwood and Prehoda 2009; Martin-Belmonte and Mostov 2008), siendo este efecto bidireccional. En mamíferos, Rho1 es capaz de modular la actividad de  $\alpha$ -PKC, a través de su kinasa efectora ROCK, y por su parte,  $\alpha$ -PKC puede fosforilar a ROCK, inhibiendo su asociación a las UA's (Nakayama, Goto et al. 2008). De esta forma, teniendo en cuenta la relación de ROCK con la regulación de la organización del citoesqueleto, éste representaría un mecanismo en el cual están interconectados los principales reguladores de la homeostasis tisular.

## 5.- MORFOGÉNESIS DEL DISCO IMAGINAL DE OJO-ANTENA Y DE LA RETINA PUPAL.

### 5.1.- Adhesión celular, polaridad celular planar (PCP) y polaridad apico-basal en el desarrollo del disco imaginal de tercer estadio larvario.

Como hemos explicado en uno de los apartados anteriores, durante el tercer estadio larvario, el surco morfogenético (SM) cruza el epitelio del disco imaginal de ojo, desde la región posterior hasta la región anterior.



**Fig 9: Reorganización celular tras el Surco Morfogenético.**

(A) Plano apical de un disco de inaginal de ojo de tercer estadio larvario en el que las membranas celulares se muestran en morado (DE-cad) y verde (Sqh-GFP). Se aprecia la generación de agrupaciones celulares distribuidas de manera altamente organizada. (B) Detalle de la misma región ampliado. La expresión de DE-cad (gris) permite distinguir la formación de las rosetas (naranja-rojo), los arcos (morado-azul) y los primeros grupos de fotorreceptores (verde). (C) Representación esquemática de la orientación de los omatidios en torno al ecuador del disco imaginal de ojo. (modificado de Escudero et al., 2007)

El surco morfogenético es una indentación claramente visible, que se genera gracias a la contracción apical de las membranas de las células que entran a formar parte del mismo. Tras el paso del surco, grupos de células se reorganizan y agrupan, formando lo que se han denominado “rosetas” y “arcos” (Fig 9 A,B) (Tomlinson and Ready 1987; Wolff and Ready 1991). Las rosetas iniciales están formadas por unas 15-20 células, que posteriormente se reducen a 9 constituyendo los arcos, los cuales a su vez se cierran dando lugar a grupos de 6-7 células: el futuro R8, los R2-R5 y un par de células que finalmente no formarán parte del omatidio (Ready, Hanson et al. 1976)(Fig

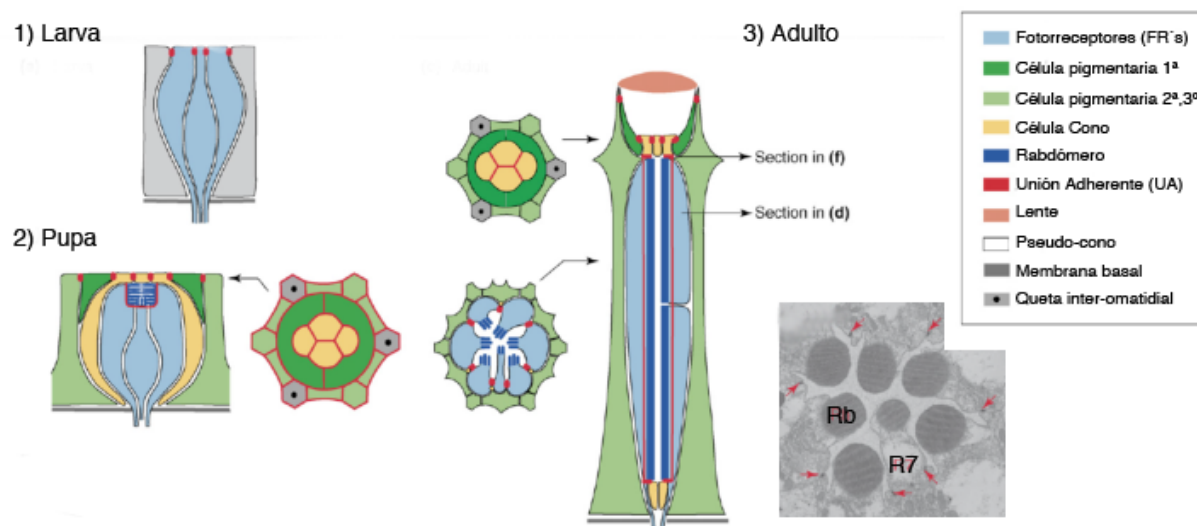


9 A,B). Estos grupos de células, según avanza el proceso de diferenciación, reclutarán otras células, formando finalmente un omatidio maduro. Estos cambios celulares, han sido descritos gracias al patrón característico y diferencial que muestran distintas moléculas de adhesión, como son DE-cadherina y su adaptador intracelular Armadillo (B-catenina) (Fig 9 A,B). Estas proteínas incrementan sus niveles de expresión en el surco morfogenético y, tras el paso de éste, se mantienen a altos niveles en la membrana apical de las células que van a constituir las rosetas y los arcos. A medida que se produce el proceso de maduración de los omatidios sólo las células que van a constituir los fotorreceptores mantiene altos niveles de estas proteínas (Fig 9 A,B). El mecanismo a través del cual se adquiere esta organización todavía no está claro, pero se ha establecido que las mismas vías de señalización que se encargan de orquestar el proceso de proliferación y diferenciación participan en este proceso. Un buen ejemplo es la vía EGFR, ya que se ha demostrado que su función es requerida para regular la proliferación y diferenciación de los fotorreceptores, así como los cambios de forma celular que acompañan la formación de los arcos y de las rosetas (Brown et al. 2006) .

En el ojo adulto los fotorreceptores que constituyen los omatidios están dispuestos de forma trapezoidal. La orientación de esta estructura es la que determina la polaridad celular planar (PCP) en el ojo. Utilizando como eje de simetría el ecuador, que coincide con el borde dorso-ventral y divide el ojo en dos mitades, los omatidios están dispuestos con una simetría especular. Esta disposición se establece durante el desarrollo larvario tras dos procesos bien diferenciados. En primer lugar se determinan los fotorreceptores R3 y R4 con respecto al ecuador. Así, el fotorreceptor más cercano al ecuador se diferencia como R3 y el más alejado como R4. Posteriormente, los omatidios rotan 90° con respecto a este borde de referencia. De manera, que la dirección de la rotación está definida por la disposición de los fotorreceptores R3 y R4, girando siempre desde el R3 hacia el R4, lo que hace que a ambos lados del ecuador los omatidios roten en direcciones opuestas (Fig 9C). Por lo tanto, la determinación de los fotorreceptores R3 y R4, es fundamental para que la morfogénesis de la retina proceda con éxito. La definición de estos dos fotorreceptores depende de la ruta de señalización de Notch y frizzled (fz). La activación de Notch induce la determinación de R4, mientras que fz inhibe la actividad de Notch. Los modelos actuales postulan que la célula cercana al ecuador presenta elevados niveles de fz, y por lo tanto baja actividad de Notch, convirtiéndose en R3. En el caso de la célula más alejada (célula polar), la actividad de fz es más baja, lo que permite la activación de Notch, y su determinación como R4. ¿Existe alguna conexión entre la regulación de este proceso y la polaridad apico-basal?. Hasta ahora no existía respuesta para esta pregunta, pero recientemente se ha descubierto un nexo de unión entre el eje de polaridad apico-basal, determinado durante el desarrollo embrionario, y el eje de polaridad del plano del epitelio (PCP), determinado durante el desarrollo larvario. La localización de fz en la región apical de la célula es un requisito para la señalización de PCP (Djiane, Yogev et al. 2005), lo que sugeriría una posible relación funcional entre las proteínas del dominio apical y la señalización que regula PCP. En base a esta posibilidad, trabajos recientes han mostrado un modelo en el que la inhibición de dPatj (Strutt 2001; Strutt and Strutt 2002) y la activación de Bazooka, suprimen la inhibición de fz mediada por Da-PKC, definiendo cuándo se activa fz y se establece la PCP. De esta forma, a pesar de que la polaridad apico-basal y la PCP parecen dos mecanismos física y temporalmente aislados, a la vista de estos resultados, parece que existe una conexión clara cuyo mecanismo de regulación está en gran parte por descubrir.

## 5.2.- Morfogénesis de la retina pupal, como modelo para estudiar la reorganización celular dentro de un epitelio.

En el estadio de pupa, los fotorreceptores sufren un cambio de forma drástico. Durante este proceso, la región apical de los fotorreceptores gira 90°, convergiendo en una estructura en la que el dominio apical se encuentra en el centro (Fig 10).



**Fig 10: Remodelación del epitelio de la retina de *Drosophila* durante el desarrollo.**

Representación esquemática de la rotación que sufren los fotorreceptores durante el desarrollo de pupa y los cambios estructurales que conlleva. (1) Corte transversal de un omatidio del epitelio de un disco de tercer estadio larvario. En rojo se muestran las UA's, que separan el dominio de membrana apical (arriba) y el dominio de membrana baso-lateral (debajo). (2) Corte transversal de un omatidio en el que los fotorreceptores que constituyen el omatidio han rotado 90° hacia la región central, disponiendo sus membranas apicales de manera que todos los fotorreceptores se encuentran enfrentados entre sí. A la derecha del omatidio, se muestra el corte tangencial en la región apical, mostrando la disposición de los diferentes tipos celulares que forman parte del omatidio en este momento del desarrollo. (3) sección transversal de un omatidio adulto, en el que se aprecia el alargamiento que ha sufrido la membrana apical de los fotorreceptores y la formación de la lente (región superior). A la izquierda, se disponen dos cortes tangenciales. El más basal (debajo) muestra la disposición y estructura de los fotorreceptores y el resto de células que forman el omatidio adulto (ver leyenda). A la derecha del omatidio, se muestra una imagen de microscopía electrónica, que se corresponde con la disposición del corte basal del omatidio. Las flechas rojas marcan las UA's.

De esta forma, el dominio apical de cada uno de los fotorreceptores que conforman el omatidio se encuentra en contacto con el del resto. En este momento, la membrana apical se subdivide en dos regiones: la central (parte más apical) se transforma en el rabadómero, formado por una red compleja de microvellosidades que formarán los órganos que captan el impulso luminoso, y la membrana del tallo sub-apical, que conecta el fotorreceptor con la zona adherente (Fig 11). Esta subdivisión se establece hacia el 50% del desarrollo pupal, mediante la segregación de sus determinantes. De manera que, la actina se acumula en la región más apical (es un componente estructural de las microvellosidades) y las proteínas del complejo Crumbs, se localizan en el tallo. Esta subdivisión requiere la actividad de PTEN, fosfatasa que regula la presencia de fosfolípidos (PIP2/3) en la ZA's. La regulación del balance de PIP2/3 es determinante para el correcto desarrollo de los fotorreceptores (Pinal, Goberdhan et al. 2006; Roch, Polesello et al. 2010). Tras ser especificados los dos dominios, tiene lugar la elongación de la membrana, proceso que requiere un control muy exhaustivo del anclaje del citoesqueleto de actina y depende de la actividad de la fa-

milia FERM (Moesina) (Karagiosis and Ready 2004). El tráfico vesicular es otro de los mecanismos determinantes durante la morfogénesis de los fotorreceptores, ya que se ha visto que mutantes para Rab11 (proteína que media el reciclaje a la membrana citoplásmica) presentan múltiples defectos en la morfología de los rabdomeros (Satoh, O'Tousa et al. 2005).

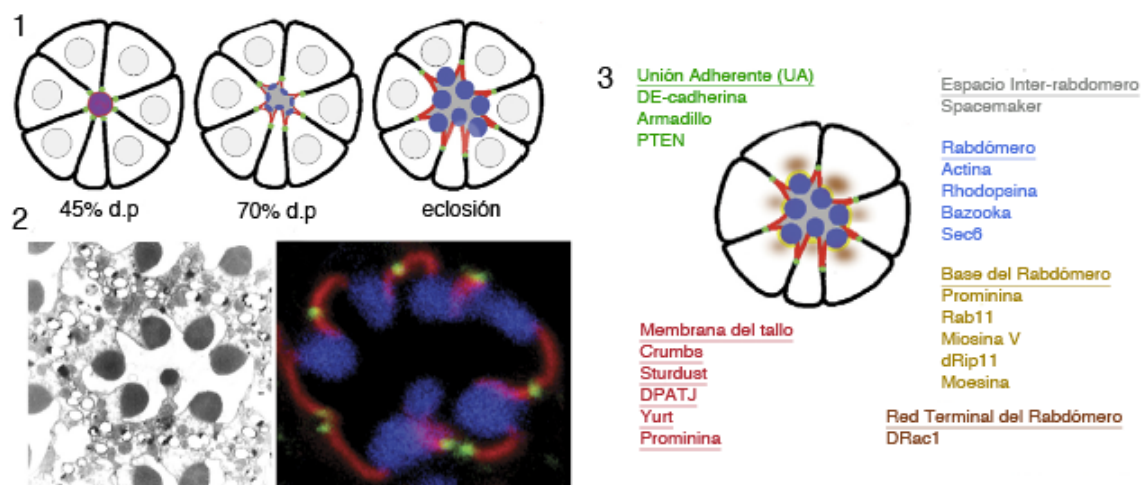


Fig 11: Cambios estructurales durante el desarrollo de pupa.

(A) Representación esquemática de los cambios morfológicos que sufren los fotorreceptores durante el desarrollo pupal, hasta el estadio adulto. Las uniones adherentes se muestran en verde, el rabdomero está marcado en azul, y el tallo en rojo. Según progresa el desarrollo pupal, los fotorreceptores se separan y se forma una cavidad central (gris). (B) Sección de un ommatidio adulto (izquierda) y plano apical de un ommatidio adulto, mostrando Armadillo en verde, marcando la UA, actina en azul, para marcar el rabdomero y Stardust en rojo, para marcar la membrana del tallo. (C) Representación esquemática de un ommatidio adulto indicando los diferentes dominios discutidos en el texto. La localización de las diferentes proteínas se indica por correspondencia de color. (Modificado de Knust, 2007)

## 6.- PÉRDIDA DE INTEGRIDAD EPITELIAL Y CÁNCER.

La mayor parte de los tumores que se generan en humanos tienen origen epitelial y suelen implicar la disregulación de la adhesión celular y/o de la polaridad apico-basal (Birchmeier and Behrens 1994; Thiery 2002). Las uniones intercelulares son reguladores fundamentales de la integridad epitelial y la homeostasis del tejido, y se ha demostrado que estas moléculas están disreguladas durante la progresión tumoral (Fung, Shackleford et al. 1985; Brown, Wildin et al. 1986). Este efecto es debido a que la Cadherinas clásicas actúan como receptores de señalización dependientes de unión, por lo que cambios en las propiedades de adhesión dan lugar a la activación de diversas vías de señalización que colaboran con la progresión tumoral, como es el caso de la vía de Wnt (Fodde and Brabletz 2007) o de EGFR (Lampugnani, Orsenigo et al. 2006).

Otra característica de las células tumorales es la pérdida de polaridad apico-basal (Gardioli, Zacchi et al. 2006). A parte de esta observación, poco se ha avanzado en la determinación del potencial oncogénico de este defecto en humanos. Sin embargo, el descubrimiento en *Drosophila* del efecto supresor de tumores por parte de diferentes reguladores de polaridad, ha despertado el interés en el estudio de la regulación de la polaridad como determinante oncogénico (Brumby and

Richardson 2005). Por un lado, se ha descrito que las larvas mutantes homocigóticas para proteínas del dominio baso-lateral (Scribble, Dlg, Lgl) se transforman en tumores neoplásicos (Yamanaka and Ohno 2008). De manera análoga, la pérdida de reguladores de polaridad induce la formación de neuroblastomas en el sistema nervioso central (SNC) larvario (Lee, Robinson et al. 2006). En otros casos, para que el efecto oncogénico se ponga de manifiesto, se requieren condiciones de estrés metabólico, como ocurre con la falta de función de Par4 (LKB1) y los componentes de su vía de señalización (Mirouse, Swick et al. 2007). A su vez, también se ha demostrado que la pérdida de polaridad puede cooperar en la progresión tumoral, ya que se ha visto que la falta de función de scribble en combinación con el efecto oncogénico de Ras<sup>V12</sup> o Notch<sup>intra</sup> induce metastasis (Pagliarini and Xu 2003). Por lo que, al menos en *Drosophila*, parece que el mantenimiento de una correcta polarización es esencial para evitar la generación de tumores. Además trabajos recientes han corroborado alguna de estas observaciones en modelos celulares humanos (Elsun, Yates et al.; Dow, Elsum et al. 2008).

## 7.- MUERTE CELULAR INDUCIDA.

### 7.1.- Cascada Apoptótica.

La muerte celular fisiológica o Apoptosis, es un mecanismo esencial durante el desarrollo normal de los organismos, ya que permite el correcto establecimiento y el mantenimiento de la arquitectura tisular. La apoptosis media la eliminación de células que se han generado en exceso y que ya no serán necesarias en las siguientes fases del desarrollo, como ocurre en la retina pupal de *Drosophila* (Mendes, Arama et al. 2006). Por otro lado, también actúa como un mecanismo de control que permite eliminar las células que acumulan fallos durante el desarrollo. De esta forma, las células dañadas o potencialmente peligrosas para el sistema son eliminadas. La maquinaria básica de inducción de muerte celular incluye varios componentes, de los cuales, la mayor parte están conservados evolutivamente. Los principales efectores de la vía son unas proteasas denominadas Caspasas que median la degradación de multitud de sustratos que finalmente conducen a la muerte celular. Como la mayoría de las proteasas, las Caspasas son sintetizadas como pro-enzimas, con escasa actividad, por lo que requieren ser activadas. Basándose en el modo de activación de las Caspasas, estas se dividen en dos tipos: Caspasas “iniciadoras”, como la Caspasa-3, que permiten el acoplamiento del Apoptosoma, y Caspasas “efectoras” que son activadas por las Caspasas iniciadoras y median la proteólisis de multitud de sustratos. En *Drosophila*, los principales activadores de la vía son los genes pro-apoptóticos *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim* (White, Grether et al. 1994). La actividad de estos genes está regulada fundamentalmente de manera transcripcional. Recientemente se ha descrito que la regulación de éstos es diferencial. En el caso de *rpr*, su expresión responde a diversas señales de estrés. Aunque no se conoce muy bien el mecanismo, se sabe que *rpr* es diana del gen de respuesta a estrés genotóxico p53 (Brodsky, Nordstrom et al. 2000), o que su expresión se activa cuando se altera la integridad epitelial. A su vez, la regulación de *hid* y *grim* depende de señales de supervivencia que provienen de las células vecinas, ya que la activación de la vía de Ras/Raf/MAPK, mediada por estas señales, es capaz de mantener bajos los niveles de transcripción de *hid*, a la vez que impide su activación mediante fosforilación (Bergmann, Agapite et al. 1998; Kurada and White 1998). El hecho de que la eliminación de estas proteínas no sea suficiente para evitar

completamente la apoptosis, sugiere que existen mecanismos adicionales para promover muerte celular (Foley and Cooley 1998). Otro nivel de regulación de la vía son las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's/Diap1 en *Drosophila*), las cuales se unen a las caspasas iniciadoras, impidiendo su actividad (Du, Fang et al. 2000; Chai, Du et al. 2000). De manera opuesta, *Reaper*, *Hid* y *Grim* actúan inhibiendo a Diap1 y liberando a las Caspasas (Goyal, McCall et al. 2000; Wang, Hawkins et al. 1999) (Fig 12).

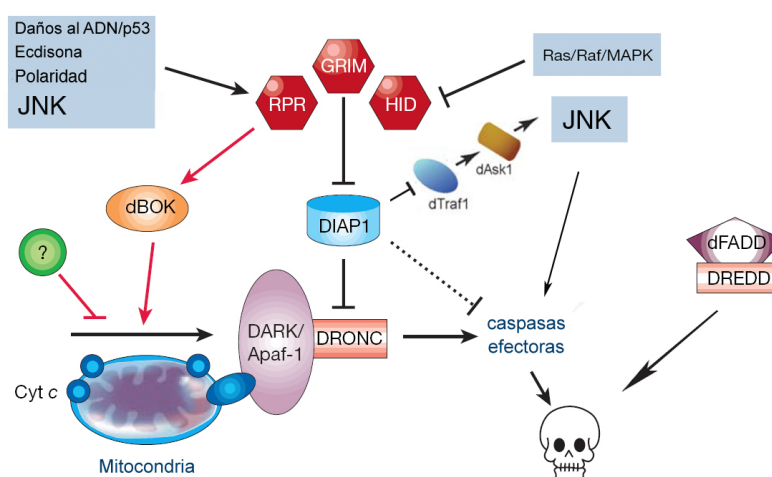


Fig 12: Representación esquemática de la vía apoptótica en *Drosophila* (modificado de Meier, 2000).

## 7.2.- Vía de la C-Jun N-terminal quinasa (JNK).

Una de las vías fundamentales relacionadas con la activación de la muerte inducida por apoptosis es la vía de la C-Jun N-terminal quinasa (JNK). El efector de la vía es la quinasa basket (bsk/JNK) que se activa gracias a la acción de la quinasa hemipterus (hep/JNKK) (Glise, Bourbon et al. 1995). La activación de Hemipterus, a su vez, depende de múltiples JNKKK's que se activan en respuesta a diversos estímulos (Boutros, 2002; Chen, White et al. 2002; Sathyanarayana, Barthwal et al. 2003). La activación de la cascada media en último término la fosforilación del factor de transcripción Jun (antígeno relacionado con Jun, Jra) (Riesgo-Escovar, Jenni et al. 1996; Sluss, Han et al. 1996) y Fos (Zeitlinger, Kockel et al. 1997), además de una amplia variedad de sustratos citosólicos. A su vez, la vía se regula negativamente por la acción de la fosfatasa *puckered* (*puc*), que es un gen diana transcripcional de Jun y Fos, estableciendo así un bucle de regulación negativo (Martin-Blanco, Gampel et al. 1998) (Fig 13). La vía parece inducir muerte celular mediante la regulación de *reaper*, puesto que la reducción de una dosis de bsk puede rescatar parcialmente el efecto de muerte celular inducida por la activación de *reaper*. A su vez, se ha establecido en discos imaginales que han sido sometidos a irradiación, que bsk puede activar a *reaper* de manera directa y dependiente de p53 (McEwen and Peifer 2005). Esta activación tiene lugar de manera transcripcional. Cabe destacar que, al igual que las Caspasas, de manera independiente a su función en muerte celular, esta vía presenta otras funciones. Las JNK's regulan diversos procesos morfogénicos como son el cierre dorsal en el embrión (Jacinto, Woolner et al. 2002), la reparación de daños en el tejido (Galko and Krasnow 2004), la polaridad y la homeostasis tisular (Pastor-Pareja, Wu et al. 2008; Boutros, Paricio et al. 1998), etc. (Fig 13)



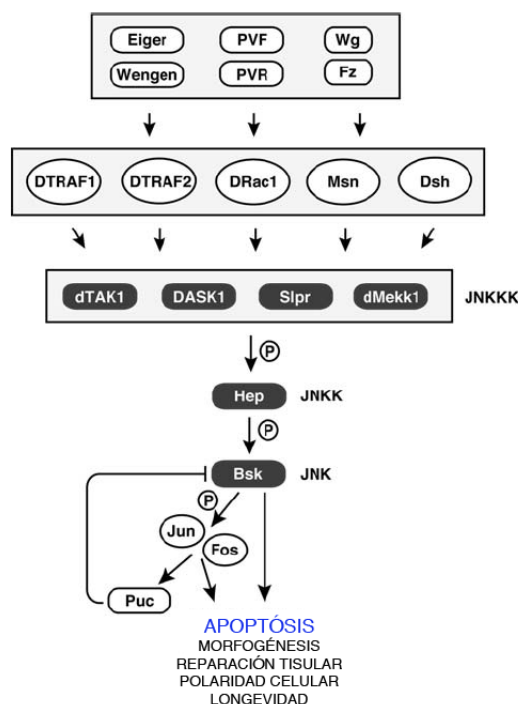


Fig 13: Representación esquemática de la vía de señalización de las JNK (modificado de Igaki, 2009).

## 8.- MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN.

Las células, a lo largo de la vida de un organismo, están sometidas a numerosos agentes que pueden producir daños en el ADN e inducir mutaciones genéticas. De hecho, el simple proceso de replicación del ADN puede dar lugar a fallos que pueden provocar cambios en la secuencia genética. Para evitar este tipo de errores existen varios mecanismos de reparación de daños en el ADN que se engloban en dos grandes grupos: recombinación homóloga (RH) y unión de extremos no homólogos (UENH). La recombinación homóloga (RH), a su vez, está formada por la conversión génica (CG), proceso en el que la secuencia perdida se restaura copiando la secuencia homóloga de la cromátida hermana o del cromosoma homólogo, y el anillamiento de hebras de ADN de cadena sencilla (AHCS), que fusiona extremos de secuencias repetidas eliminando segmentos de ADN. El proceso de CG es conservativo, mientras que el AHCS no lo es, ya que se pierde el ADN comprendido entre las secuencias repetidas. Por otra parte, la UENH suele ser mutagénica, ya que une las secuencias que flanquean la rotura del ADN, aunque en ocasiones la ruptura genera hebras con extremos romos que permiten reparar el daño de forma conservativa (Fig. 14).

Durante el desarrollo suele operar fundamentalmente la conversión génica, y cuando se habla de recombinación homóloga se suele aludir a este mecanismo. Durante la meiosis, la RH presenta funciones vitales, ya que asegura la correcta segregación de los cromosomas homólogos y da lugar a variabilidad mediante el intercambio de información genética. En las células somáticas, actúa como un mecanismo de control esencial para la viabilidad celular. La RH permite la reparación de las hebras dañadas por agentes tóxicos como puede ser la radiación, de los telómeros

incompletos originados por el mal funcionamiento de la telomerasa (20), evita entrecruzamientos indebidos entre cromosomas homólogos, o repara horquillas de replicación defectuosas (22). Por esta razón, mutaciones en la mayor parte de los factores que intervienen o regulan este proceso suelen ser letales en homocigosis en estadios muy tempranos del desarrollo (Krogh and Symington 2004). Así pues, la mayoría de estos factores se han encontrado utilizando modelos basados en la reparación de roturas del ADN de doble cadena en condiciones hipomorfos para los mismos (Szostak, Orr-Weaver et al. 1983). Estos modelos han establecido que, tras la rotura del ADN, la reparación implica varias etapas (Fig 14).

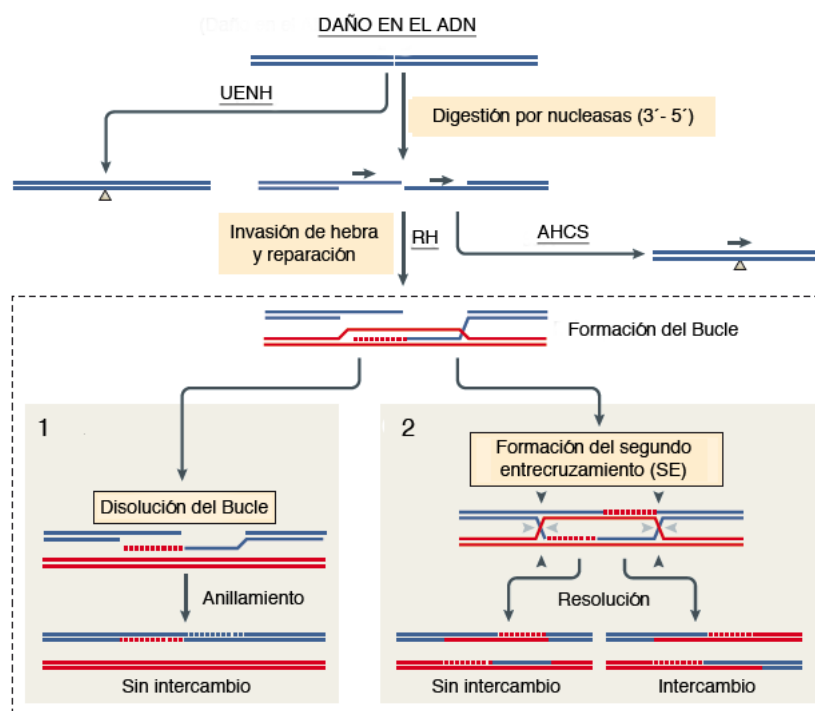


Fig 14: Representación esquemática de los mecanismos de reparación de daño en el ADN (modificado de San Filippo, 2008)

En primer lugar se generan extremos de ADN de cadena sencilla mediante la acción de nucleasas, permitiendo así el acoplamiento de la recombinasa. Posteriormente se produce la invasión de una de las hebras del cromosoma homólogo que servirá como molde para la síntesis de la zona pérdida, creándose un bucle de ADN temporal. En este punto se puede proseguir de varios modos, lo que a su vez determina si el proceso de reparación es conservativo o no. Por un lado, se puede deshacer el bucle temporal y generar la otra hebra utilizando como molde la hebra recién sintetizada (Fig. 14 (1)). Por otro lado, se puede formar un segundo entrecruzamiento (SE) entre la hebra molde y la de nueva síntesis, que puede resolverse con o sin intercambio entre cromátidas (Fig 14. (2)). Tanto si se deshace el bucle de manera directa como si el segundo entrecruzamiento se resuelve sin intercambio entre cromátidas, el proceso es conservativo, mientras que si se produce el intercambio entre éstas, el reparto del material genético será desigual entre las células hijas.

Alteraciones en los distintos procesos de reparación del ADN dan lugar a inestabilidad cromosómica (INC), pérdida de heterocigosis (PDH) y adquisición de mutaciones (Kusano, Johnson-

Schlitz et al. 2001; Leng, Chan et al. 2006). De esta forma, la desregulación de proteínas que actúan sobre las diferentes etapas de reparación de roturas del ADN, está asociada al desarrollo de síndromes que se caracterizan por la formación de múltiples tumores que suelen malignizarse (LaRocque, Stark et al. 2011; Lee, Yoon et al. 2012). Por lo tanto, el mantenimiento del correcto balance de estas proteínas es esencial para mantener la homeostasis del organismo.

## 9.- ANTECEDENTES DEL GEN SELECCIONADO PARA SU CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL (*ALD*/MPS1).

Uno de los genes identificado en la búsqueda dirigida que hemos llevado a cabo ha sido *altered disjunction (ald)*. Este gen codifica para el ortólogo en *Drosophila* de la serina treonina quinasa mps1 (Liu and Winey). La función de esta quinasa como regulador del mecanismo de control de la unión de los cromosomas al huso acromático durante la mitosis (“mitotic spindle checkpoint”) ha sido estudiada en detalle, tanto en *Drosophila* como en células de mamífero, ya que está conservada evolutivamente (Gilliland, Hughes et al. 2007; Cui and Guadagno 2008). Está descrito que *Ald* impide la entrada en anafase hasta que todos los cromosomas se han unido de manera correcta a los microtúbulos del huso acromático a través de sus cinetocoros (Fischer, Heeger et al. 2004). Fallos de este mecanismo de control conllevan defectos en la segregación de los cromosomas, dando lugar a aneuploidias. En humanos, las aneuploidias son la principal causa de defectos al nacer. Así mismo, multitud de células tumorales presentan esta anomalía en su número de cromosomas (Borysova, Cui et al. 2008; Cui and Guadagno 2008).

Hasta el momento, la función del ortólogo en humanos (hmps1/ttp) ha sido extensamente caracterizada debido al interés que suscita el hecho de que sus niveles estén desregulados en multitud de líneas celulares tumorales (Liu and Winey). El incremento de los niveles de hMps1 suele obedecer a una estabilización de la proteína y se corresponde con una activación de la misma, vía autofosforilación (Cui and Guadagno 2008). La activación de esta proteína ha sido relacionada con respuesta a estrés genotóxico y en respuesta a la activación de la vía EGFR (Cui and Guadagno 2008; Huang, Chang et al. 2009). Por otro lado, debido a su función como regulador del mecanismo de control mitótico, se ha asumido que su contribución a la progresión tumoral está mediada por la generación de inestabilidad cromosómica (INC). No obstante, todavía no se han analizado otras funciones que pudieran estar contribuyendo a la progresión tumoral de manera independiente a la adquisición de aberraciones cromosómicas.

Gran parte del trabajo de esta tesis se centra en la caracterización fenotípica y funcional de *ald* en *Drosophila*. En este trabajo hemos identificado nuevas funciones para esta quinasa. Estas funciones, en el caso de estar conservadas en humanos, podrían ayudar a entender el papel que juega esta quinasa en el desarrollo de tumores.



## II. OBJETIVOS

---



El objetivo inicial de esta tesis fue profundizar en los mecanismos a través de los cuales la rutas de señalización controlan la proliferación y/o diferenciación celular durante el desarrollo. Para ello, utilizando como modelo el disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster*, llevamos a cabo una búsqueda de genes candidatos a estar regulando estos procesos.

A partir de los datos obtenidos en esta búsqueda, centramos el estudio en el análisis del efecto producido por la línea *EP-M50.2*. De esta forma, nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- Determinación del gen responsable del fenotipo producido por la sobre-expresión de la línea *EP-M50.2*

Una vez establecido que el gen *altered disjunction (ald)* era el causante de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de la línea *EP-M50.2* quisimos :

- Caracterizar los fenotipos de falta y ganancia de función de *ald* en distintas estructuras epiteliales, como son el disco de ojo y de ala.

- Buscar los genes diana sobre los que actúa *ald* para regular el mantenimiento de la integridad epitelial.

- Establecer cuales son las vías implicadas en la regulación de *ald*.

- Caracterizar la función de *ald* como regulador negativo de la recombinación mitótica

- Analizar el papel de la desregulación de esta quinasa en la biogénesis y progresión tumoral.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1. Cultivo de *Drosophila*.

El mantenimiento de las estirpes y cruces de *Drosophila melanogaster* fue llevado a cabo en medios de cultivo estándar (CC) y en cámaras a 25°C, salvo en algunos casos en los que se mantuvieron a 17°C ó a 29°C.

### 1.1. Ensayo de estrés metabólico.

Para los experimentos de estrés metabólico se modificó el contenido de glucosa y levadura de la siguiente forma:

Comida del Centro (CC)	Comida Neutra (CN)	Comida Restrictiva(CR)
18%glucosa	5% glucosa	0% glucosa
11% extracto de levadura	5% extracto de levadura	1% extracto de levadura
5 % harina de trigo	3.5% harina de trigo	3.5% harina fe trigo
1% agar	0.8% agar	0.8% agar

## 2. Estirpes de *Drosophila*.

Como referencia se utilizaron las cepas *Oregon-R* o *w<sup>1118</sup>*. Los alelos mutantes utilizados para este trabajo han sido: *aldMps1* (Fischer, Heeger et al. 2004), *ald<sup>B4</sup>* (Page, Nielsen et al. 2007), *lk-b1<sup>4A42</sup>* (Amin, Khan et al. 2009), *Rho<sup>1720</sup>*, *warts<sup>G4808</sup>*, *Def<sup>H99</sup>*, *shg<sup>2</sup>*, *moe<sup>C856</sup>* (Molnar and de Celis 2006).

Los experimentos de expresión ectópica se llevaron a cabo mediante el sistema *GAL4-UAS* (Brand y Perrimon, 1993) (Fig. 1). Para este trabajo se emplearon las siguientes líneas *Gal4*: *GMR-Gal4*, *ey-Gal4* y *mirror-Gal4* en el disco de imaginal de ojo-antena, y *en-Gal4* (Brand y Perrimon, 1993), *sal<sup>EPp</sup>-Gal4* (Cruz et al., 2009), *nub-Gal4* (Calleja et al., 1996) y *patch-Gal4* en el disco imaginal de ala-notum. En los casos en los que fue necesario, estos drivers se combinaron con UAS-red stinger o UAS-GFP (Ito et al., 1997), bien para marcar el territorio de expresión o para equiparar dosis en experimentos de interacción. Cuando la combinación de estas líneas con los diferentes UAS utilizados resultaba en letalidad, se co-expresó la proteína *Gal80<sup>TS</sup>*. Esta proteína permite inhibir la actividad del *Gal4* de forma controlada, ya que su expresión depende de la temperatura y se inhibe a 29°C (temperatura restrictiva).

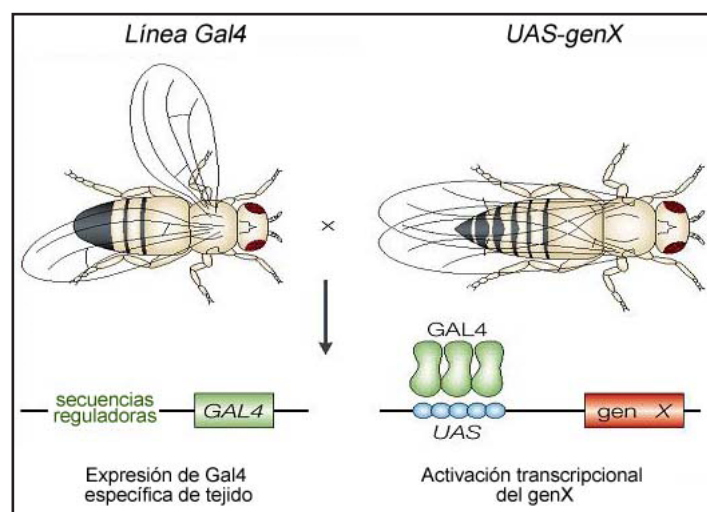


Figura 1. Sistema GAL4-UAS.

Este sistema permite dirigir la expresión de un gen de interés X a un tejido concreto y en un momento determinado. Para ello el activador transcripcional de levaduras (*Gal4*) es insertado en el genoma de *Drosophila* en posiciones al azar. Esto permite generar líneas de moscas en las que la proteína *Gal4* se expresa en el patrón temporal y espacial específico definido por las secuencias reguladoras junto a las que se ha insertado. La proteína *Gal4* sólo funciona cuando se une a sus correspondientes secuencias diana (*UAS*, upstream activating sequences), activando entonces de manera constitutiva la expresión de cualquier gen que se encuentre a continuación de dichas secuencias. Tomado de (Brand, 1993).

Las líneas EP utilizadas para la búsqueda realizada fueron generadas por el Dr. Jose Felix de Celis (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006). Las líneas UAS utilizadas fueron las siguientes: *UAS-p35* (Hay et al., 1994), *UAS-puc2A* (Martin-Blanco et al., 1998), *UAS-NiMH504* (de Celis y Bray, 1997). Las líneas UAS-ARNi provienen del centro de stocks de Viena (VDRC (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>)) o de Japón (Kyoto (<http://www.dgrc.kit.ac.jp/>)).

Las líneas UAS creadas en el laboratorio fueron las siguientes: *UAS-aldFlag* (Cr. II), *UAS-ald<sup>Flag10.X.1</sup>* (Cr. III), *UAS-ald<sup>KDFlag33</sup>*, *UAS-spnA<sup>Myc isoA 5 2</sup>*, *UAS-spnA<sup>Myc isoB B7</sup>*



La referencia para la descripción detallada de las distintas cepas se puede consultar en <http://flybase.bio.indiana.edu/stocks>. Todas aquellas líneas cuyo origen no ha sido especificado provienen del Centro de stocks de Bloomington. Recientemente, parte de la colección de líneas EP del laboratorio ha sido incorporada a este Centro.

### 3. Sistema de detección de la actividad de Rho1:

Para visualizar la actividad de la vía de la GTPasa Rho1, se utilizó la línea UAS-RBD (Dominio de unión a Rho1, del inglés “Rho Binding Domain”). Como se describe previamente (Simoes et al., 2006), este transgén permite expresar en el dominio de expresión de una línea Gal4 concreta, una proteína unida a GFP que es capaz de unirse a la proteína Rho1 activa, mientras que no puede unirse a la proteína Rho inactiva. En el clonaje de esta proteína, la mutación en tres sitios específicos del dominio de activación fosforilable de la GTPasa Rho1 (dominio PKN) son la clave para que la unión tenga lugar únicamente con Rho1. Esto permite localizar la GFP al estado activo de Rho1; así, como describen sus autores, esta construcción sirve de “sensor” in vivo de la activación de la GTPasa Rho1 facilitando así visualizar las células en las que la vía se encuentra activa.

### 4. Inactivación ectópica de genes: silenciamiento con cepas UAS ARNi

La interferencia de RNA se basa en la fragmentación de una molécula ARN de doble cadena (ARNdc) en unidades más pequeñas que inducen la degradación específica de secuencia del RNA mensajero de un gen determinado. En *Drosophila*, la producción de ARN de interferencia (ARNi) puede dirigirse mediante el sistema Gal4-UAS y así interferir en la función de un gen en un tejido y momento determinados del desarrollo (Dietzl et al., 2007).

### 5. Sistemas utilizados para el análisis clonal

#### 5.1) Inducción de clones mediante el sistema FLP/OUT:

Este sistema se basa en una construcción que presenta el promotor de actina en cis con la secuencia que da lugar a la proteína Gal4. Estas secuencias, se encuentran interrumpidas por la presencia de un casete acotado por dos FRT's que, por acción de una flipasa (inducida por choque térmico), recombinan y permiten la expresión del gen que se quiera estudiar. Además, los clones se visualizan porque el gen objeto de estudio y la proteína GFP se expresan de forma simultánea (Golic and Lindquist 1989).

#### 5.2. Sistema de recombinación basado en secuencias FRT:

Para inducir los clones se emplea la enzima recombinasa de levaduras denominada flipasa (FLP) y las secuencias (FRT) que reconocen dicha enzima para actuar (Xu and Rubin 1993). Esta técnica se conoce como método de FLP/FRT. La expresión de la flp es dirigida al exponer las larvas a la temperatura de inducción (37°C), puesto que es dirigida por un promotor de respuesta a choque térmico (promotor de “heat shock” (hs)). Tras su inducción, los clones se diferencian por la ganancia y/o pérdida de marcadores, como es la proteína verde fluorescente (GFP).

## 6. Métodos de Bioquímica y Biología molecular:

### 6.1. Ensayos de co-inmunoprecipitación:

Los ensayos de coimmunoprecipitación se llevaron a cabo como se detalla en (Neisch, et al. 2010)

### 6.2. Detección de los niveles de fosforilación de Sqh mediante "Western-blot"

- La detección de los niveles de fosforilación de Sqh se llevó a cabo como se detalla en (Neubueser, 2010)

### 6.3. Generación de líneas UAS y de expresión en células S2

Los distintos ADN's circulares de partida se solicitaron al DGRC (Para obtener información detallada ir a la página web: <https://dgrc.cgb.indiana.edu/>). Para las PCR's de amplificación se utilizó la enzima a prueba de errores KOD (Invitrogen). Los clonajes se llevaron a cabo mediante técnicas de recombinación, utilizando el vector p-entry (penar direccional TOPO cloning Kits, invitrogen) y la batería de vectores del sistema Gateway disponible en el laboratorio.

El diseño de los primers se realizó siempre de la misma manera:

PF: Secuencia CACC a la que se añadieron los 5 primeros tripletes de nucleótidos de la secuencia codificante para la proteína de interés. En los caso en los que fue necesario, debido a las características de la secuencia codificante del gen, se alteró el número de tripletes, normalmente se incrementó.

PR: Secuencia complementaria y reversa de Los 5 últimos tripletes. En el caso que se quisiera añadir una marca (HA, Flag, Myc) a la proteína, se eliminó el codón de parada.

Los primers fueron los siguientes:

PF ald : 5' CACCATGACCACGCCTGTG 3'

PR ald: 5' ATTGCTGTTGGCGGT 3'

PF spn-A iso A: 5' CACCATGGAGAAGCTAACGAATGTTTCAG 3'

PR spn-A iso A: 5' GCTCTCCCTGGCGTCTCCTATTCC 3'

PF spn-A iso B: 5' CACCATGGCCATTCCCGGCTTGGGCGGC 3'

PR spnA- sio B: 5' GATGGAATAGGAGACGCCAGGGAGAGC 3'

### 6.4. Mutagénesis dirigida.

Para la generación de la forma Kinasa inactiva de ald (ald<sup>KDDA478</sup>) se utilizó la batería de herramientas ( QuikChange ® Site-Directed Mutagenesis, stratagene) . Los primers utilizados fueron los que se detallan a continuación:

PF 5' GCAGACTGAAGTTGATCGATTTTGGCATAGCCAGCAATATC 3'

PR 5' GATAATTGCTGGCTATGCCAAAATCGATCAACTTCAGTCTGC 3'

### 6.5. Inducción y purificación de la proteína de fusión ald-GST-His.

El vector de partida (pT41a-ald) fue cedido amablemente por el Dr William Gilliland (Gilliland, Hughes et al. 2007).

Para la inducción de la proteína se tuvo que poner a punto el protocolo de inducción, debido a la letalidad ocasionada por la expresión basal de ald en las distintas cepas de bacterias. Finalmente, se determinó que el tiempo y temperatura óptimos para la inducción era de 12h a 18°C. Las bacterias se crecieron en un medio de cultivo generado por el servicio de fermentación. Para la lisis, se utilizó un procedimiento mecánico, para evitar la insolubilización de la proteína. Una vez lisada la muestra se purificó la proteína mediante una columna de níquel, utilizando un método desnaturizante (ProBond™ Purification System, Invitrogen).

### 6.6. Generación del anticuerpo específico de ald.

Para generar el anticuerpo de ald se diseñaron péptidos correspondientes a regiones hidrofílicas de la proteína, que se asociaron a una molécula que facilita la inmunización. Por otro lado, se utilizó la proteína de fusión generada y purificada en el laboratorio. El método de inmunización y purificación obedeció a técnicas estándar.

La secuencia de los péptidos diseñados es la siguiente:

Péptido de la región comprendida entre los aa 170-200: TEERRPLQETETPLRNELPST

Péptido de la región comprendida entre los aa 10-30: SDEDDFNTPYRPRQAAAGER

## 7. Tinciones Histológicas e Inmunohistoquímicas.

Las tinciones histológicas mediante hibridaciones con sondas de ARN e inmunohistoquímicas, fueron realizadas mediante protocolos estándar para *Drosophila*, para información sobre dichas técnicas se pueden encontrar en la página Web de la profesora Laura Johnston. [http://cpmcnet.columbia.edu/dept/genetics/faculties/Johnston/Protocols\\_page.html](http://cpmcnet.columbia.edu/dept/genetics/faculties/Johnston/Protocols_page.html). Las tinciones que requirieron un procedimiento especial son las siguientes:

### 7.1. Ensayo de detección de Fase S del ciclo (Edu).

Para la detección de ADN en fase replicativa se puso a punto el sistema de incorporación de EdU (Click-iT EdU HCS Assays, Invitrogen; basado en Salic y Mitchison, 2008). Finalmente se estableció el protocolo general: Disección de 18 larvas como máximo en medio Insect-XPRESS (MI) (Lonza) o PBS1x. Posteriormente, se incubaron en 100 µl de una solución 1 mM EdU en MI+1% FBS durante 60 min con agitación a 25 °C. Se fijó el tejido en 400 µl de PBS-PFA 4% durante 1 hora con agitación. Se realizaron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3%. Se incubó con los anticuerpos primarios durante 16 h a 4 °C en PBS+0,1% Triton+BSA 3%. A continuación se realizaron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres lavados de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3% antes de incubar con el anticuerpo secundario en PBS+0,1% Triton+BSA 3% durante 48 h a 4 °C. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 20 min en PBTr 0,1% y tres de 20 min en PBS+0,1% Triton+BSA 3% antes de incubar durante 30 min en Click-iT reaction buffer (preparado en el momento según el protocolo comercial). Finalmente, se realizaron 3 lavados de 20 minutos en PBTr 0.1%.

### 7.2. Ensayo de detección de la forma fosforilada de Moesina (P-Moe).

En el caso de la inmunodetección con anti-P-Moesina se disecaron las larvas en PBS+Paraformaldehído 4% (PBS-PFA) en hielo durante un tiempo máximo de 5 min. Se retiró el PBS-PFA y se incubó 20 min en PBS-PFA nuevo a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados de 15 min en PBTr (PBS+ 0,3% Triton X100, Sigma). Se deshidrató el tejido mediante incubación durante 5 min en diluciones de etanol al 30%, 50%, 70% en PBS. Se hicieron 2 lavados en metanol absoluto y se mantuvo 24 h en metanol a -20°C. Se rehidrató el tejido mediante incubaciones de 5 min en etanol 70%, 50% y 30% en PBS. Se realizaron tres lavados de 15 min en PBTr y tres lavados de 15 min con PBTr+BSA 1%. Se incubó con el anticuerpo anti-dPERk durante 16 h a 4 °C. La incubación con el anticuerpo secundario se hizo según el protocolo de Cubas y cols., 1991).

### 7.3. Ensayo de detección de muerte celular: TUNEL.

Las células apoptóticas se marcaron mediante dos procedimientos:

Por un lado se utilizó el anticuerpo que reconoce la forma activa de la caspasa-3 humana (Cell Signaling Technology), y que reconoce también la forma activa de la caspasa efectora Drice de *Drosophila* (Yu et al., 2002). Por otro se llevó a cabo la tinción TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick Endo-Labeling, Roche) que pone en evidencia la fragmentación del ADN característica de las células apoptóticas (Gavrieli et al., 1992; White et al., 1996). Las hibridaciones in situ se realizaron según la metodología descrita en el volumen *Drosophila* Protocols (Sullivan et al., 2000). La sonda de ARN para *dpp* fue sintetizada a partir del plásmido BS-*dpp* (proporcionado por A. Macías), que fue digerido con *KpnI* y transcrito con la ARN polimerasa T3.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: conejo anti-β-Gal (1:2000) (Cappel), anti-digoxigenina (ratón) (Roche, Basel, Switzerland), ratón anti-Engrailed (1:50) (Hybridoma Center), anti-Elav (1:200, rata y ratón), anti-Armadillo (1:10) ratón (N2 7A1), rata anti-DE-caderina (1:20), ratón anti- Discharge (1:50), ratón anti-wingless (1:50), conejo anti-ratón anti-Histona-3 fosforilada (Cell Signalling Technology) (1:1000), conejo anti-cleaved Caspase 3 (#9661) (1:50), conejo anti P-Ezrin/Radixin/Moesin (#3141), conejo anti-P-Myosin light chain 2 (Ser-19) (#3671), (Cell Signaling Technology, Beverly,MA) (1:100), conejo anti-Sqh 1P, rata anti-Sqh 2P ( Los anticuerpos secundarios utilizados proceden de Jackson Immunological Laboratories (1:200)). De manera simultánea a la incubación con los anticuerpos secundarios se incubó con faloidina conjugada con TRITC (tetrametilrodamina B isotiocianato, Sigma, 1:200) para visualizar la actina cortical.

## 8. Preparación de muestras para su análisis por Microscopía electronica.

Para obtener las muestras para llevar a cabo el análisis mediante microscopía electronica de Barrido, las moscas fueron congeladas a -80°C para mantener la ultraestructura del tejido.

En el caso de las muestras de microscopía electronica de barrido. Los adultos fueron fijados y deshidratados para su posterior procesamiento por parte del personal del servicio de microscopía. Las técnicas utilizadas fueron rutinarias para llevar a cabo ultramicrotomía de muestras incluidas en resina.

## 9. Métodos de microscopía y procesamiento de imágenes.

### 9.1. Microscopía óptica.

Las imágenes se tomaron con una cámara DFC425 (Leica) en un microscopio Axiophot (Zeiss).

### 9.2. Microscopía confocal.

Se utilizaron los equipos del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”: Confocal MicroRadiance acoplado a microscopio vertical Axioskop 2 (Zeiss) o Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

### 9.3. Microscopía Electrónica.

Tanto para tomar las imágenes de microscopía electrónica de barrido como para las imágenes de microscopía electrónica convencional se utilizaron los equipos del servicio de microscopía del CBMSO (Microscopio Electrónico de Transmisión JEM1010 Jeol).

### 9.4. Procesado de imágenes.

Las imágenes se procesaron digitalmente con programas de tratamiento de imágenes: Zeiss LSM Image Browser 3.5, Zen (Zeiss), ImageJ 1.41 o Adobe PhotoShop CS2.



## IV. RESULTADOS

---





## 1.- BÚSQUEDA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN NEURONAL

La búsqueda que llevamos a cabo con el fin de encontrar genes candidatos a estar regulando los procesos de proliferación y diferenciación neuronal, se desarrolló en las distintas etapas que se detallan a continuación:

### 1.1.- Análisis de los fenotipos de ojo adulto.

En la primera fase de búsqueda, analizamos el fenotipo de ojo adulto de la descendencia de los cruces realizados entre machos de 456 líneas EP (colección del laboratorio del Dr. Jose Felix de Celis (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006) y hembras *GMR-Gal4*. Todas aquellas líneas cuya sobreexpresión dio lugar a alteraciones morfológicas del ojo o resultaron ser letales fueron seleccionadas para un segundo análisis. En total, 298 líneas (65% del total de líneas analizadas) cumplieron estos criterios, mientras que las 138 líneas restantes (30%) no mostraron ninguna alteración de la morfología del ojo, por lo que fueron descartadas.

Atendiendo a las alteraciones observadas en el ojo adulto (Fig 1), definimos las siguientes categorías:

- Morfología alterada
- Necrosis
- Ausencia de ojo
- Letalidad

- Rugosidad
- Superficie lisa (brillante)
- Aumento de tamaño
- Disminución de tamaño

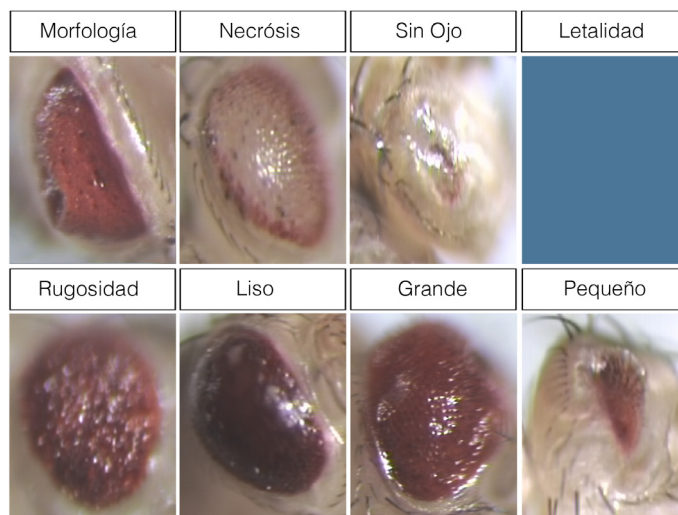


Fig 1: Categorías establecidas en base a los fenotipos de ojo adulto obtenidos al cruzar las distintas líneas EP de las que disponíamos por la línea *GMR-Gal4*.

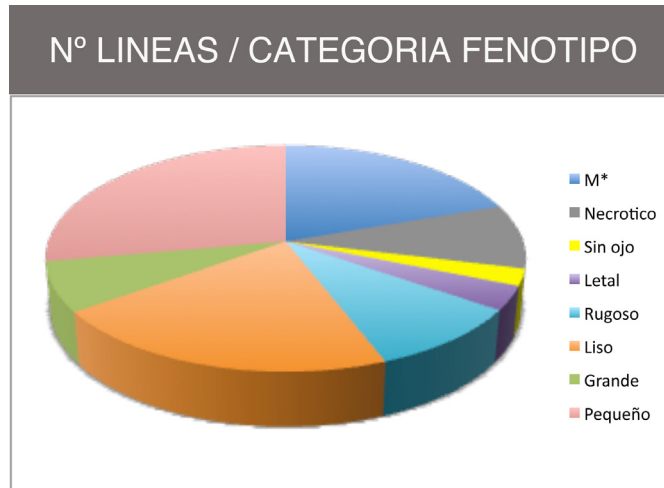
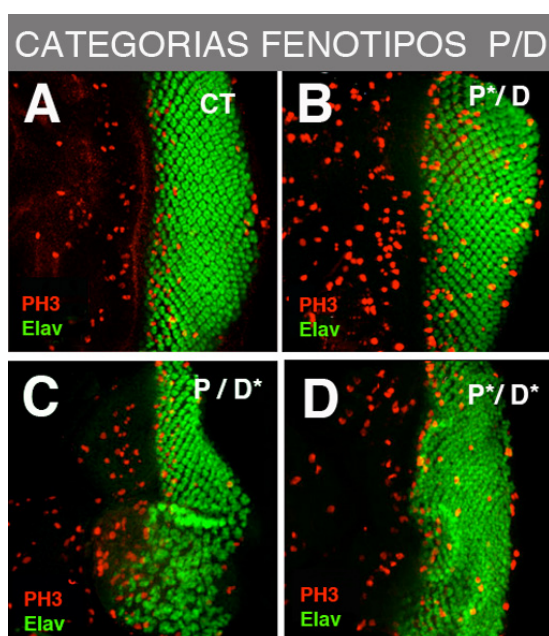


Gráfico 1: Representación gráfica del porcentaje de las líneas que hemos incluido en cada una de las diferentes categorías que hemos establecido en base al fenotipo de ojo adulto de la primera fase del “screening”.

El número de líneas que pertenece a las distintas categorías está reflejado en el Gráfico1. Analizando los porcentajes, se aprecia que el fenotipo más representativo es la reducción en el tamaño del ojo, seguido de el cambio en la morfología y necrosis. Dentro de la categoría de aumento o disminución del tamaño del ojo, se realizaron subdivisiones atendiendo a distintos matices (rugosidad, volumen... etc.), aunque para facilitar la comprensión de los resultados optamos por agruparlos.

## 1.2.- Análisis del patrón de división y diferenciación en el disco imaginal de ojo de tercer estadio larvario.

Las variaciones fenotípicas descritas con anterioridad podrían deberse a que distintos procesos celulares, no relacionados con el control de la proliferación y/o diferenciación neuronal estuvieran alterados. Por ejemplo, una disminución del tamaño del ojo, puede deberse a un incremento de muerte celular. Por esta razón, para definir qué genes al ser sobre-expresados alteraban de forma específica la división celular y/o el proceso de diferenciación neuronal, llevamos a cabo un segundo proceso de selección en el que se analizaron estos dos parámetros mediante técnicas inmunohistoquímicas. Para el estudio del patrón de división utilizamos un anticuerpo que reconoce de forma específica una forma fosforilada de la Histona-3 (PH3 Ser10), modificación que se establece durante la mitosis. El patrón de diferenciación neuronal se analizó utilizando un anticuerpo contra un antígeno neuronal (Elav). El análisis de ambos marcadores se realizó en discos de ojo de tercer estadio larvario de la descendencia resultante de los cruces de la estirpe *GMR-Gal4* por las líneas previamente seleccionadas.



**Fig 2: Categorías en las que se han clasificado las distintas alteraciones del patrón de proliferación y la diferenciación**  
Las categorías fueron obtenidas al sobre-expresar las diferentes líneas EP por *GMR-Gal4*. Las categorías se corresponden con: (A) ausencia de alteración, (B,C) alteración de uno de los procesos de forma aislada y (D) alteración simultánea.

Basándonos en este segundo estudio, seleccionamos 184 líneas (67%) que dieron lugar a cambios en el patrón de expresión de PH3 y/o Elav y descartamos 90 (33%), 50 de ellas por carecer de fenotipo y 40 porque no pudimos repetir el cruce. De las líneas seleccionadas, 94 presentaban fenotipos sutiles y repetitivos, por lo que finalmente también fueron eliminadas. De esta manera, una vez finalizado este segundo análisis, obtuvimos un listado de 52 líneas que afectaban de forma clara al proceso de proliferación y/o diferenciación neuronal. Según el fenotipo, cada línea fue clasificada en tres categorías (Fig 2)

- Diferenciación normal y proliferación alterada ( $D= / P^*$ )
- Diferenciación alterada y proliferación normal ( $D^* / P=$ )
- Diferenciación y proliferación alteradas ( $D^* / P^*$ )

El porcentaje de líneas definidas en cada categoría está representado en el Gráfico 2.

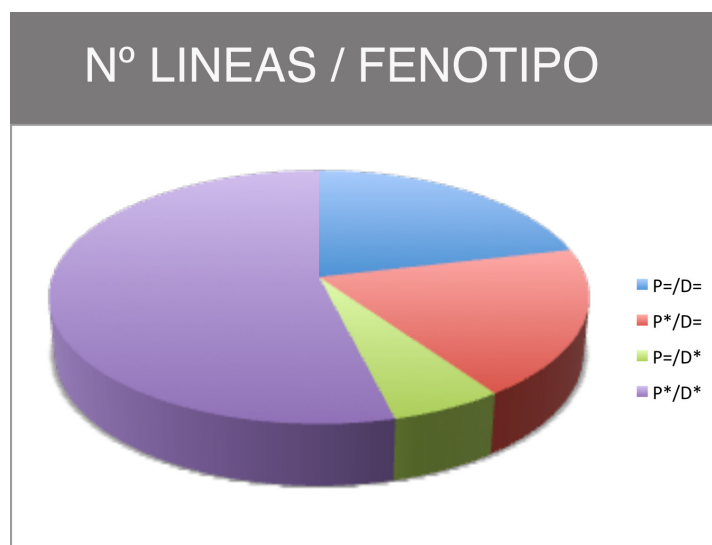


Gráfico 2: Representación gráfica del porcentaje de líneas que afectan a los procesos de proliferación y/o diferenciación celular. Todas estas líneas fueron seleccionadas en base a su fenotipo de ojo adulto en la primera fase del “screening”.

### 1.3.- Selección de genes para el análisis monográfico.

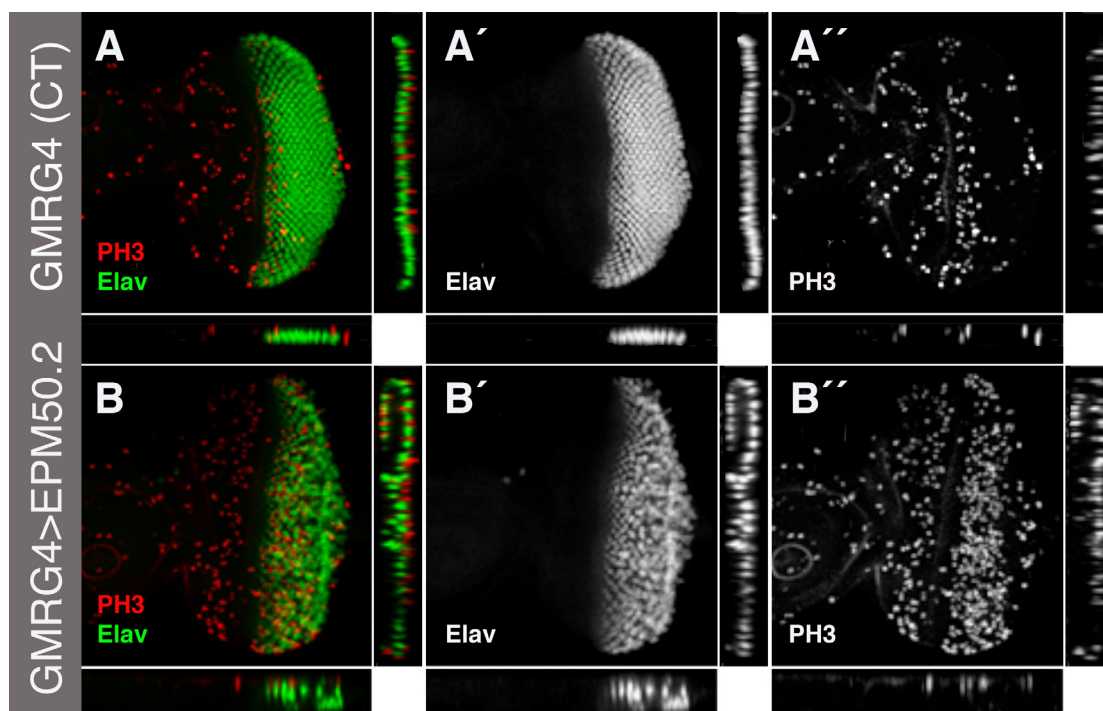
Tras concluir las etapas anteriores, y a partir de los resultados obtenidos, generamos una tabla que contenía el resumen de los datos de las líneas seleccionadas (Anexo 1). Estos datos fueron analizados de manera conjunta con otras tablas generadas en estudios anteriores llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Jose Felix de Celis (Molnar, Lopez-Varea et al. 2006). Estas tablas hacían referencia a: localización citológica de la inserción, fenotipo resultante de la sobre-expresión dirigida por diferentes líneas Gal4, fenotipo de la primera y segunda fase de búsqueda; posibles genes responsables del fenotipo, función biológica, naturaleza molecular...etc. (*Flybase* y *Pubmed*). Teniendo en cuenta todos estos datos, se seleccionaron cinco líneas para profundizar en su análisis. Las líneas *EP-M50.2*, *EP-405*, *EP-501*, *c420.1* y *c573*.

Cabe destacar que 21 de las líneas seleccionadas en las dos primeras fases de la búsqueda (40.4%), corresponden a genes previamente identificados y cuya función es requerida para el control de la proliferación y/o de la diferenciación neuronal (*e2f*, *sos*, *rbo*, *cdt1*, *hb*... etc). Este resultado refuerza la validez de la búsqueda realizada, y sugiere que los genes identificados en nuestro análisis podrían estar involucrados en los procesos objeto de estudio.

## 2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN RESPONSABLE DEL FENOTIPO DE SOBRE-EXPRESIÓN DE LA LÍNEA *EP-M50.2*

Con estos antecedentes, el trabajo de esta tesis se ha enfocado en el estudio monográfico de la línea *EP-M50.2*. Esta línea, en combinación con *GMR-Gal4* es letal en estadio de pupa temprana. Durante el desarrollo larvario observamos que los discos imaginales de ojo presentan una

alteración de la distribución de los fotorreceptores. Además, encontramos que el número de células en mitosis, positivas para el marcador PH3, estaba incrementado de manera significativa en comparación con los discos control (Fig. 3).

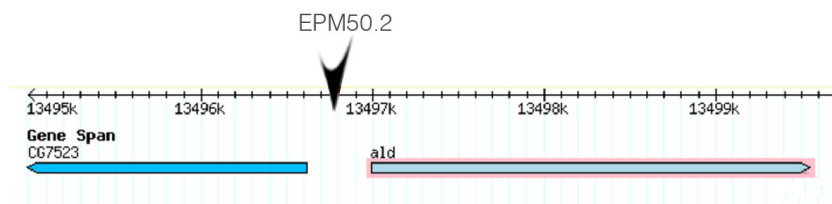


**Fig 3:** Efecto de la sobre-expresión de la línea EPM50.2 en el patrón de proliferación y diferenciación, en el disco imaginal de ojo-antena de tercer estadio larvario.

Composición en la que se observa el disco imaginal de ojo de *Drosophila* en el tercer estadio larvario. El panel superior muestra un disco control (*GMR-Gal4*) y los cortes en el eje z, transversal (dcha.) y longitudinal (región inferior). Se aprecia la organización característica de los omatidios, teñidos con el marcador neuronal Elav (verde (A), Gris (A'')) y un patrón de división normal (A,A''); al azar en la región anterior al surco morfogenético (derecha) y organizada en la SDM (indicada por una flecha (A')) tras el surco morfogenético (vano apreciado en el límite con la tinción para Elav). La proliferación se ha detectado con el marcador de mitosis PH3 (rojo (A), Gris (A'')). En el panel inferior se puede observar un disco en el que se ha sobre-expresado con *GMR-Gal4* la línea EPM-50.2. y se aprecia un claro incremento en el marcaje de PH3 en una banda de un grosor anómalo (B, B''(flecha)). (B,B') El patrón de diferenciación también se encuentra alterado, presentando los fotorreceptores una distribución desorganizada, existiendo marcaje fuera de la región apical (derecha en el corte transversal del disco o la región superior del corte longitudinal) que es la zona donde se localizan, también se aprecian espacios sin marcaje de Elav que se corresponden con las zonas de acúmulo de células marcadas para PH3.

En esta línea, el elemento EP está insertado entre los extremos 5' de los genes *CG7523* y el *CG7643* (*ald*) (Fig. 4)

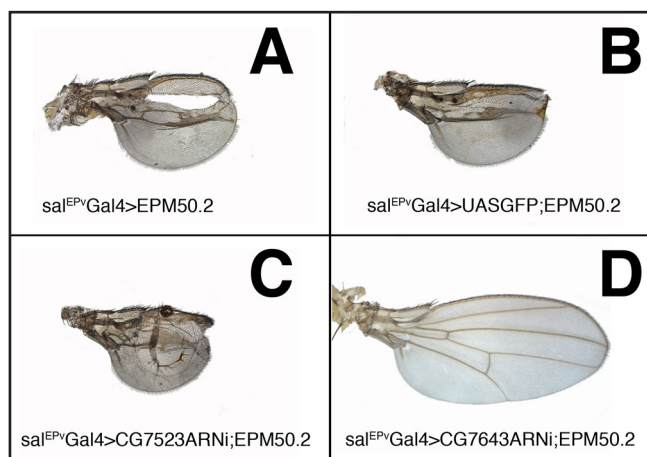
La función biológica del gen *CG7523* se desconoce, y no se dispone de datos sobre su naturaleza molecular. El gen *altered disjunction* (*ald*) o *CG7643*, codifica para una proteína con actividad Serina/Treonina quinasa. Dicha proteína está involucrada en múltiples procesos biológicos, entre los que cabría destacar su participación en mecanismos de control del ciclo celular o “checkpoint celular” y respuesta a estrés en condiciones de hipoxia (Fischer, Heeger et al. 2004).



**Fig 4: Esquema de la región en la que se encuentra insertado el elemento EP M50.2.**

Los genes adyacentes al lugar de inserción del EP son el gen altered disjunction (*CG7643*) y el *CG7523*.

El elemento EP utilizado para la generación de las diferentes líneas analizadas contenía secuencias UAS tanto en el extremo 5' como en el 3'. De manera que, dependiendo del lugar de inserción de este elemento es posible que varios genes pudieran ser sobre-expresados a la vez. Considerando el lugar de inserción del elemento EP en la línea seleccionada, fue necesario verificar cuál de los dos genes citados en el apartado anterior era el responsable del fenotipo observado. Para ello, primero intentamos rescatar el fenotipo causado por la sobre-expresión de esta línea bloqueando la función de los genes adyacentes utilizando un ARN interferente específico para cada uno de estos genes (Perrimon, Friedman et al. 2007). Para este experimento, se utilizó la línea *sal<sup>EP</sup>-Gal4*. Esta línea dirige la expresión del factor de transcripción Gal4 a partir del tercer estadio larvario en la región central del disco imaginal de ala.



**Fig5: Rescate del fenotipo producido por la sobre-expresión de la línea EPM50.2 mediado por el ARNi del *CG7643* (*ald*).**

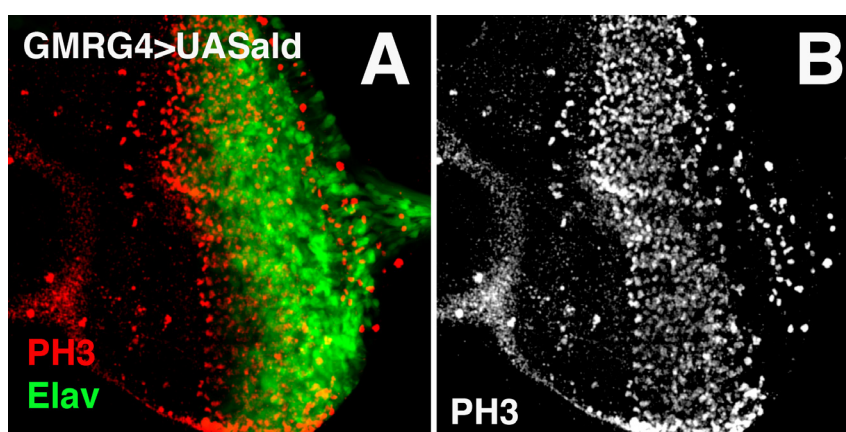
(A) Fenotipo de ala adulta correspondiente a la sobre-expresión del elemento *EP-M50.2* utilizando la línea *sal<sup>EP</sup>-Gal4*. (B) Control del efecto del número de UAS. (C) Falta de rescate por parte del UAS-*CG7523*ARNi. (D) Rescate total mediado por la expresión del ARNi del *CG7643* (*ald*).

Cuando la línea *EP-M50.2* se combina con *sal<sup>EP</sup>-Gal4* obtenemos adultos que presentan un fenotipo claramente identificable. El tamaño del ala adulta de estas moscas es menor que el de las alas control, y se aprecia una pérdida de tejido en la región de sobre-expresión; dicha pérdida se evidencia por la fusión de las venas o por la presencia de agujeros (Fig. 5A). Este fenotipo no se modificó en combinación con un *UAS-GFP* (Fig. 5B), por lo que la mera alteración de la dosis de regiones UAS presentes no es suficiente para dar lugar a una titulación del fenotipo. La co-expresión de la línea *EP-M-50.2* en combinación con el ARN-i del *UAS-CG7523* tampoco revirtió el fenotipo de sobre-expresión de la línea *EP-M50.2* (Fig. 5C). Sin embargo, la sobre-expresión del ARN-i del *UAS-CG7643* en combinación con esta línea produjo un rescate del 100%, dando lugar a un ala de apariencia silvestre (Fig. 5D). La sobre-expresión de cada uno de los ARNi's con *sal<sup>EP</sup>-Gal4* de forma independiente dio lugar a alas comparables a alas control (datos no mostrados).



Todo esto sugiere que el gen responsable del fenotipo de la sobre-expresión de la línea *EP-M50.2* es el *CG7643*, también conocido como *altered disjunction (ald)*.

Teniendo en cuenta el resultado del experimento anterior, decidimos generar una línea transgénica de moscas que contuviera la construcción *UAS-ald*. La expresión del *UAS-ald* bajo el control de la línea *GMR-Gal4* fue letal en estadio de pupa temprana, al igual que ocurría con la línea *EP-M50.2*. Además, el patrón de PH3 y Elav en discos de ojo de tercer estadio larvario que sobre-expresaban este gen era similar al de la línea *EP-M50.2* (Fig. 6). Considerando todos estos resultados, concluimos que *ald* era el gen responsable del fenotipo causado por la sobre-expresión de los genes asociados a la línea *EP-M50.2*.



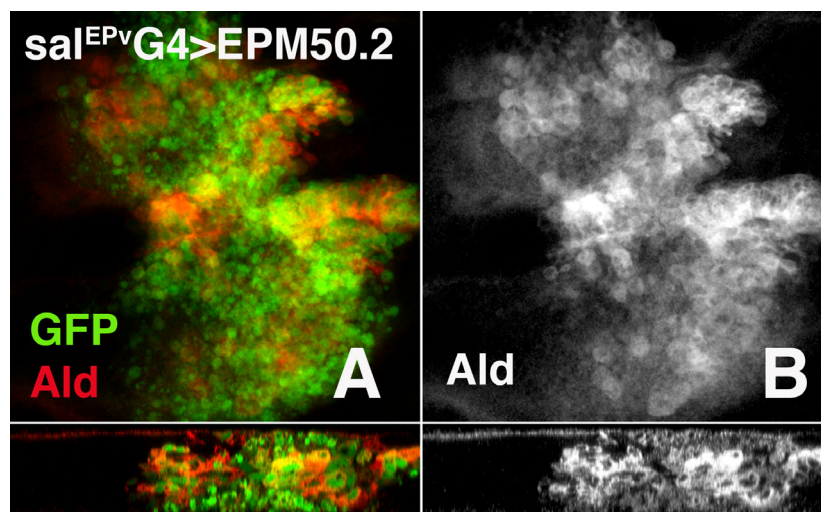
**Fig 6:** La sobre-expresión de *ald* mimetiza el efecto de la sobre-expresión del *EP-M50.2*.

Expresión del marcador de mitosis (PH3, rojo (A), gris (B)) y del marcador neuronal (Elav, verde (A)) en un disco del genotipo *GMR-Gal4>UASald*. Este disco muestra el incremento en el número de células mitóticas y la desorganización del patrón de fotorreceptores observado en los discos *GMR-Gal4>EPM50.2* (ver figura 3).

### 3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DEL GEN *ALTERED DISJUNCTION (ALD)*

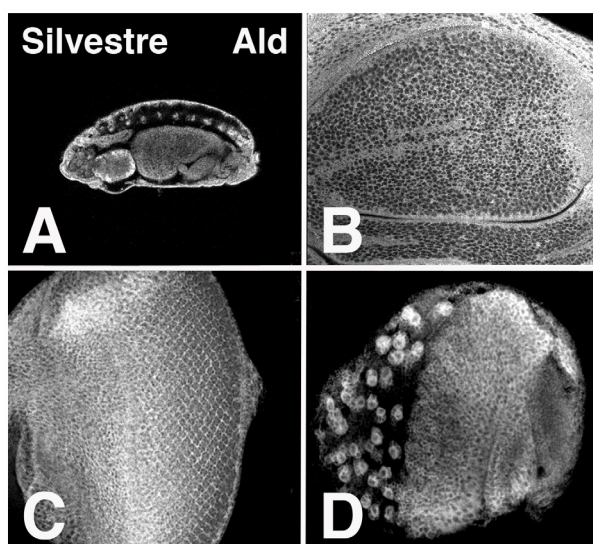
#### 3.1.- Patrón de expresión de *Ald* durante el desarrollo.

Trabajos previos habían analizado la expresión de *Ald* durante estadios embrionarios, centrándose en el estudio de su localización intranuclear durante las distintas fases de la mitosis (Fischer, Heeger et al. 2004; Gilliland, Hughes et al. 2007). De esta forma, considerando el fenotipo que nos llevó a la selección de este gen para su estudio, nos pareció necesario profundizar en el análisis del patrón de expresión de la proteína *Ald* durante el desarrollo larvario. Con este objetivo, decidimos generar un anticuerpo que reconociera *Ald* de forma específica (ver Materiales y Métodos). En primer lugar, la especificidad y eficiencia del anticuerpo fue testada mediante tinción inmunohistoquímica en discos del genotipo *Sal<sup>EP</sup>-Gal4>EP-M50.2*, observándose un marcado incremento de los niveles de *Ald* en el dominio de sobre-expresión (Fig. 7). A su vez, también se comprobó mediante ensayos de “western blot” que el anticuerpo anti-*Ald* es capaz de reconocer el antígeno utilizado para la inmunización de los animales en los que fue generado, visualizándose una banda de unos 27KDa que se corresponde con el peso molecular predicho (datos no mostrados).



**Fig 7:** *Ald* se sobre-expresa en discos *sal<sup>EPv</sup>Gal4>EP-M50.2*.

(A,B) Plano medio del epitelio y corte tangencial de discos *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;EP-M50.2*. Las células que sobre-expresan el elemento EPM50.2 están marcadas por la expresión de GFP (en verde) (A), y su patrón de expresión coincide con la expresión de *Ald* (rojo (A), gris (B)).



**Fig 8:** Patrón de expresión de *Ald*

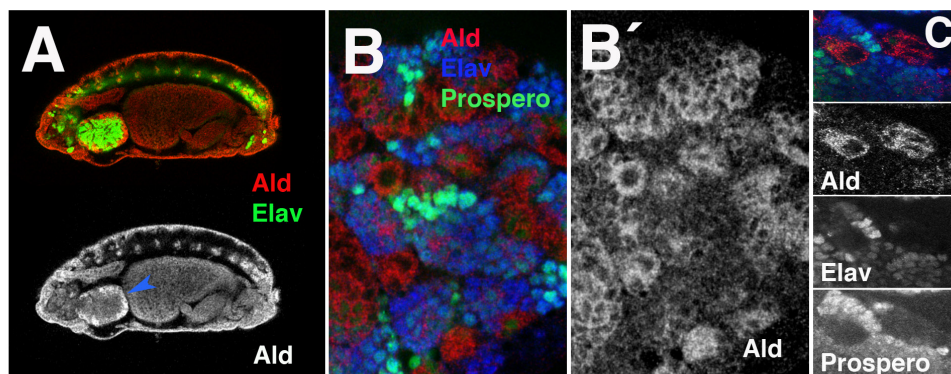
(A) Estadío embrionario. (B,C) Disco imaginal de ala y de ojo-antena (tercer estadío larvario). (D) Lóbulo del cerebral del SNC de larvas de tercer estadío larvario.

Tras la validación del anticuerpo, procedimos al estudio del patrón de expresión de *Ald* durante los estadios embrionario y larvario. De esta forma, comprobamos que *Ald* se expresa durante todo el desarrollo y su expresión es ubicua, aunque sus niveles no son homogéneos, ya que distinguimos regiones con niveles de expresión más elevados que otras (Fig. 8). En el sistema nervioso existe un enriquecimiento de *Ald* en las células precursoras de las neuronas, los neuroblastos (Fig. 9 A-C). Estos niveles se reducen drásticamente en células que han comenzado el proceso de diferenciación, como son las células positivas para Elav o Prospero (Fig. 9C)

En el caso de los discos imaginales, en el disco de ojo-antena, se aprecia un ligero incremento de los niveles de *Ald* en torno al surco morfogenético (Fig. 9C), mientras que en el disco imaginal de ala, se observa un aumento restringido a la región del borde dorsal-ventral (Fig. 9B). Esta dife-



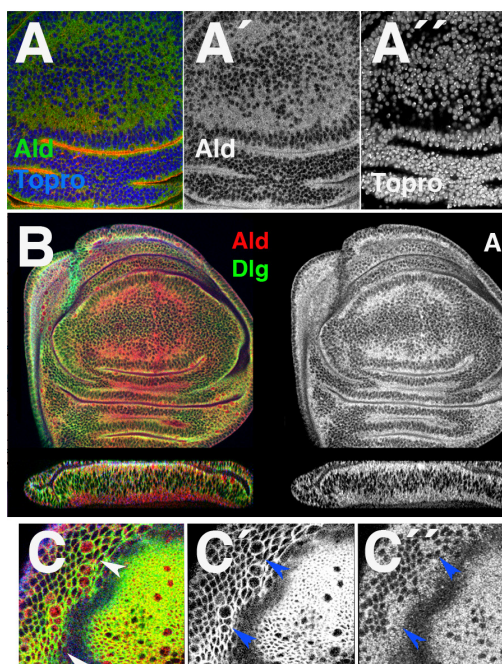
rencia de niveles está regulada a nivel transcripcional, ya que observamos la misma distribución del ARNm de *ald* cuando realizamos una hibridación *in situ* con una sonda de ARN específica contra este gen (datos no mostrados).



**Fig 9: Enriquecimiento de Ald en los neuroblastos.**

(A) Patrón de expresión embrionario de Ald (rojo) y del marcador neuronal Elav (verde). En el lóbulo cerebral (flecha) el patrón de expresión de Ald es complementario al patrón de expresión de Elav, estando Ald enriquecido en la corteza cerebral (región donde se localizan los neuroblastos (flecha)). (B) Ampliación de un lóbulo cerebral del SNC larvario en el que se muestra el patrón de expresión de Ald (rojo) y de los marcadores de diferenciación (Prospero (verde) y Elav (azul)). Los niveles de Ald son más elevados en las células de mayor tamaño (NB's) y en aquellas que no expresan prospero ni Elav (B,B',C). (C) Detalle a más aumentos de dos neuroblastos.

A su vez, también caracterizamos la distribución subcelular de *Ald*. Para ello realizamos dobles marcajes con anti-*Ald* y marcadores de diferentes compartimentos celulares. En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de *Ald* y el marcador nuclear Topro (Fig. 10A). Esto nos permitió definir que *Ald* se expresa a bajos niveles en el núcleo, y que fundamentalmente se localiza en el citoplasma



**Fig 10: Ald se localiza fundamentalmente en el citoplasma**

(A) Ampliación de un disco imaginal de ala silvestre teñido para Ald (verde) y el marcador nuclear topro (azul). Ald no colocaliza con Topro. Las figuras A' y A'' muestran un patrón complementario. (B) Plano central y corte transversal de un Disco imaginal de ala teñido para Ald (rojo) y el marcador de polaridad basolateral Dlg (verde). (C) Amplificación en la que se muestra la presencia de Ald en el núcleo de células en mitosis (flechas).

En segundo lugar, realizamos un marcaje para *Ald* y la proteína de membrana baso-lateral Dlg. Esta tinción nos permitió observar que existe una co-localización parcial entre ambas proteínas (Fig. 10 B, C). Además, nos llamó la atención que en las células que se van a dividir (células de mayor tamaño y redondeadas, localizadas en la región apical del epitelio), *Ald* se encontraba distribuido de manera más homogénea por toda la célula, incluyendo el núcleo (Fig. 10 C). Este dato concuerda con resultados observados en humanos con el ortólogo de *Ald* (*Mps1*), que establecían que *Mps1* se importa al núcleo justo antes de que la célula entre en división (Ren, Cam et al. 2002). Todos estos resultados indican que *Ald* presenta un patrón intracelular dinámico, asociado a la progresión del ciclo celular, con localización mayoritariamente citoplasmática durante la interfase.

### 3.2.- Caracterización fenotípica de la falta de función de *ald* durante el desarrollo del ojo y ala.

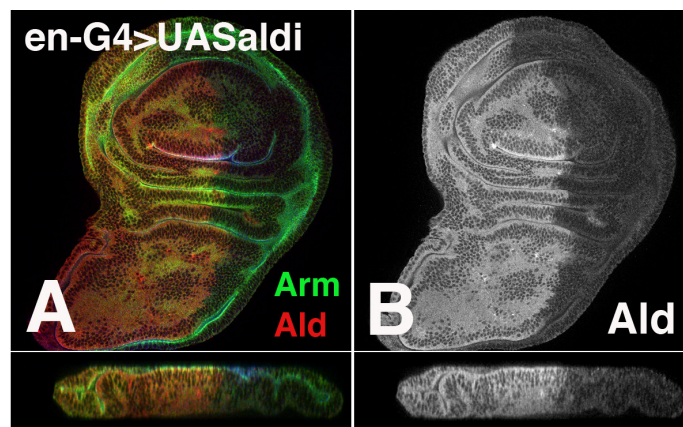
#### 3.2.1) Descripción de los alelos utilizados.

Para caracterizar la función de *ald* durante el desarrollo de los discos imaginales, utilizamos los alelos de falta de función *aldMps1* (Fischer, Heeger et al. 2004) y *aldB4* (Page, Nielsen et al. 2007). El alelo *aldMps1* se considera nulo y se generó gracias a la inserción de un elemento Piggy-Bac en el codón 26 del gen, que genera un ARN mensajero truncado que sólo contiene el primer exón y que, por lo tanto, elimina toda la región C-terminal (Fischer, Heeger et al. 2004). La caracterización fenotípica de este alelo mostró que la gran mayoría de los mutantes homocigóticos morían como adultos en el farato, pero que una pequeña fracción eclosionaba y mostraba un fenotipo de ojos rugosos y alas mal plegadas (Fischer, Heeger et al. 2004). El fenotipo de los mutantes fue completamente revertido por un transgen (gEGFP-*Ald*) que expresaba la proteína de fusión EGFP-*Ald* bajo el control de la región reguladora de *ald*. Este rescate indicaba que los efectos observados en los individuos mutantes homocigóticos *aldMps1* se debían a la falta de función de *ald*. Uno de los problemas planteados durante la caracterización de este alelo fue distinguir si el fenotipo relativamente débil en cuanto a viabilidad que presentaban los mutantes homocigóticos se debía a que la función de *ald* no era importante durante las fases iniciales del desarrollo, o bien si respondía a que la contribución materna era suficiente como para compensar la insuficiencia producida por este alelo. Para analizar esta última posibilidad, en el laboratorio de Christian Lenher generaron clones en la línea germinal (Fischer, Heeger et al. 2004), observando que gran parte de los mutantes se desarrollaban hasta el estadio de pupa, hecho que les llevó a concluir que la contribución materna no era la causa de la debilidad de los fenotipos generados por este alelo de *ald*.

El alelo mutante *aldB4* se debe a una mutación puntual que genera un codón de terminación que da lugar a una proteína truncada de 48aa. Mediante análisis genético se comprobó (Page, Nielsen et al. 2007) que este alelo no complementaba con *aldMps1* y que el fenotipo mutante revertía completamente al expresar una copia silvestre de *ald*. Por lo tanto se determinó que los fenotipos que mostraban los mutantes homocigóticos *aldB4* eran debidos específicamente a una insuficiencia del gen *ald* (Page et al., 2007). Debido a la existencia de varias mutaciones adquiridas asociadas al cromosoma que contenía el alelo *aldMps1*, decidimos analizar los fenotipos producidos por la falta de función de *ald* utilizando el alelo nulo *aldB4*.

### 3.2.2) Descripción del fenotipo generado por la expresión del ARN-i de *ald*.

La validez del ARN-i de *ald* fue analizada, en primer lugar, mediante el rescate del efecto de la sobre-expresión, tal y como se ha descrito con anterioridad. En segundo lugar, expresamos el ARN-i de *ald* mediante la línea *en-Gal4* y teñimos los discos imaginales resultantes de este cruce utilizando el anticuerpo anti-*Ald* que habíamos generado (Fig. 11). Se observó una reducción marcada de los niveles de *Ald* en el compartimento posterior, correspondiéndose con el territorio de expresión del ARN-i. En base a estos resultados, consideramos el ARN-i de *ald* como una herramienta eficaz a la hora de estudiar el efecto de la falta de función de *ald*.



**Fig 11: La expresión ectópica del ARNi de *ald* elimina de manera eficiente la expresión de *Ald*.**

(A) Plano medio y corte transversal de un disco imaginal de ala del genotipo *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>* (29°C) teñido para *Ald* (rojo) y el marcador de Uniones Adherentes (Armadillo). (B) Los niveles de *Ald* se reducen de manera notable en el compartimento posterior (dominio de expresión del gen engrailed).

### 3.2.3) Análisis fenotípico de la falta de función de *ald* durante el desarrollo de ojo.

#### 3.2.3.1.-Ojo adulto.

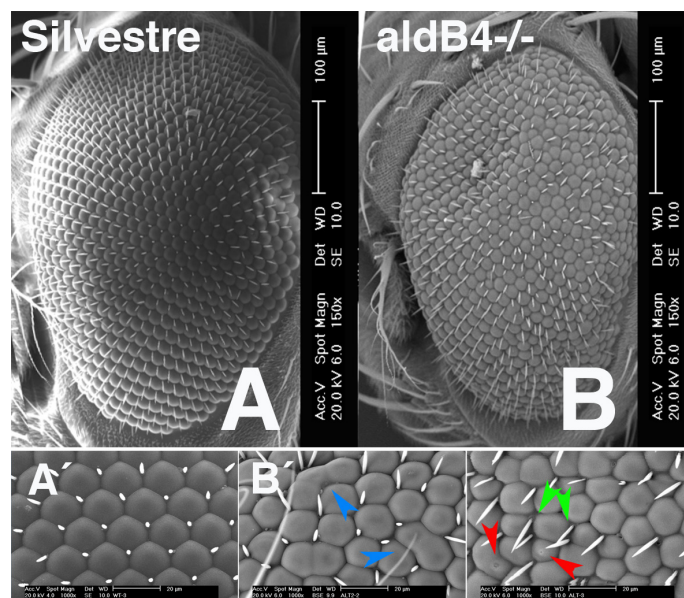
El fenotipo macroscópico de los mutantes homocigóticos para el alelo *aldB4* fue similar al descrito para el alelo *aldMps1* (Fischer, Heeger et al. 2004). Las pocas moscas adultas que fueron capaces de eclosionar presentaron ojos de tamaño reducido comparado con los controles y aspecto rugoso. Mediante microscopía electrónica de barrido analizamos en detalle los defectos estructurales de estos ojos y observamos que los omatidios eran más pequeños, estaban dispuestos a diferentes niveles dentro del epitelio y, en ocasiones, sus membranas se fusionaban o presentaban agujeros en su superficie (Fig. 12). Por otro lado, las quetas que de forma normal se distribuyen de forma simétrica en tres de las seis esquinas del hexágono en el que se disponen los omatidios, desaparecían o se agrupaban de forma anómala (Fig. 12).

De la misma forma, la expresión del ARN-i específico para *ald* en el ojo dio lugar a defectos morfológicos evidentes. Para dirigir la expresión del ARN-i utilizamos la línea *ey-Gal4*, que se expresa de forma generalizada en el disco de ojo y se mantiene durante todo el desarrollo. En este caso, el fenotipo resultante de los adultos *ey-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi/+</sup>* a 25°C y 29°C fue un ojo rugoso, de menor tamaño y cuya desorganización recordaba al fenotipo de los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>*. Sin embargo, cuando se analizaron los adultos *ey-Gal4>UASald<sup>ARNi/-</sup>* homocigóticos a 25°C, el fenotipo de ojo



resultante fue más drástico que el de los mutantes homocigóticos *aldB4*, presentando una reducción del tamaño considerable. A 29°C la expresión del ARNi resultó ser letal embrionario.

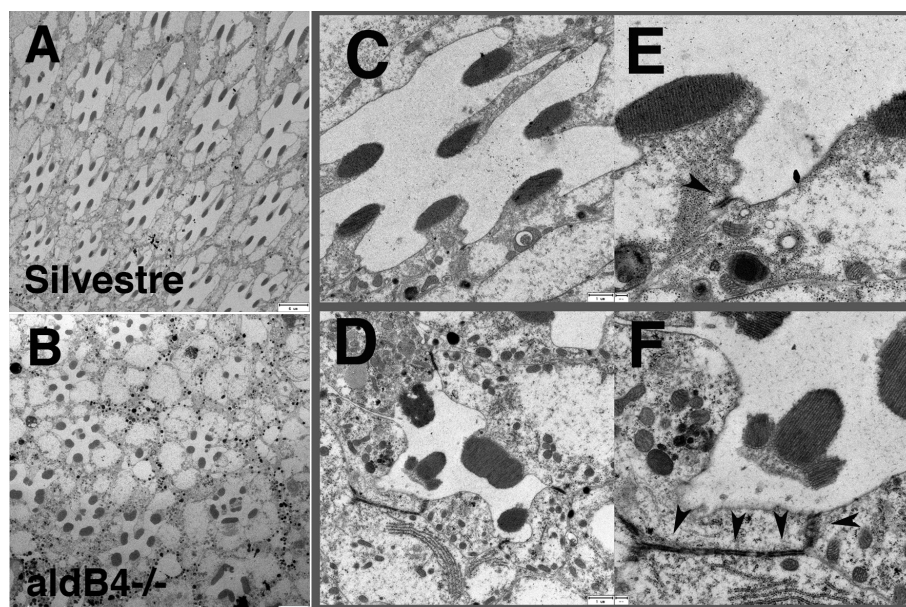
El hecho de que la eliminación de *ald* utilizando el ARN-i produzca fenotipos más fuertes que los observados en individuos mutantes homocigóticos para este gen, podría deberse a que en ocasiones el ARN es muy estable y los ARN interferentes dirigen su degradación de forma activa.



**Fig 12: Fenotipo de ojo adulto de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>.**

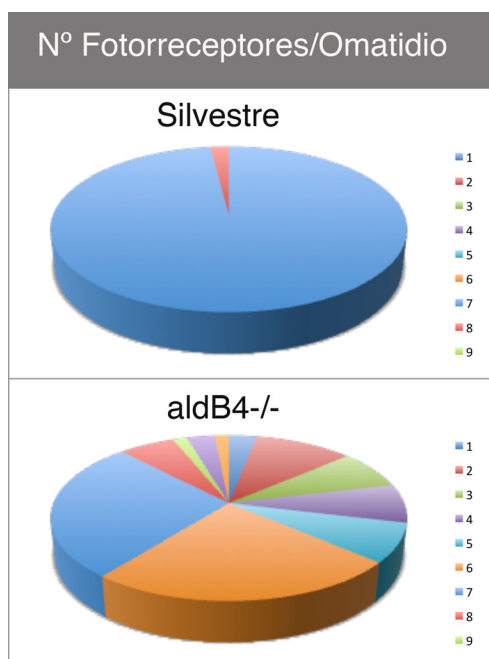
(A) Micrografía de Ojo adulto de *Drosophila* (estirpe silvestre) obtenida por Microscopía electrónica de barrido. La imagen muestra la retícula altamente organizada característica de este órgano. (B) Micrografía de Ojo adulto de mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. (A',B') Detalle a más aumentos de la organización y estructura de los omatidios y de las quetas. (B') Defectos observables en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>: fusión de omatidios (Flechas azules), aparición de quetas ectópicas (Flechas verdes) y aparición de agujeros en la superficie de los omatidios (flechas rojas).

Para entender las causas de los defectos macroscópicos que se observan en el ojo adulto mutante para *ald*, estudiamos la estructura de los omatidios que conforman este órgano. Para ello, realizamos un análisis mediante microscopía electrónica de secciones ultrafinas de ojos de individuos mutantes y los comparamos con ojos controles. En estas secciones observamos que los ojos silvestres presentan un patrón de omatidios regular, visualizándose siete de sus ocho fotorreceptores (Fig.13A). Sin embargo, en el caso de los ojos mutantes, dicho patrón se encontraba totalmente alterado (Fig. 13B) y los omatidios contenían un número variable de fotorreceptores que oscilaba entre 1 y 12, siendo más habitual la reducción de su número (Gráfica 3). Las membranas de los rabdomeros (situados en la región apical del fotorreceptor) se encontraban desorganizadas, y ocasionalmente se fusionaban con la membrana de otros rabdomeros adyacentes (Fig.13C-F). Las uniones adherentes, presentes en la región sub-apical de las membranas, también estaban afectadas (Fig.13E,F). Estas uniones suelen presentar un tamaño y localización muy regular, pero en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> se podían apreciar expansiones baso-laterales, localización incorrecta, desintegración o incremento en su número, posiblemente debido a que algunas están fragmentadas (Fig.13E,F).



**Fig 13: La estructura y distribución de los fotorreceptores en retinas adultas de mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* esta alterada**

(A,B) Secciones ultrafina (70nm) de retinas de moscas adultas (silvestres y mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>*). (A) Las retinas silvestres presentan la típica organización en “panal de abeja” formada por omatidios de estructura regular que muestran 7 de los 8 fotorreceptores que los constituyen. (B) Los omatidios de las retinas *aldB4<sup>-/-</sup>* se distribuyen de manera aleatoria, presentando marcadas diferencias de tamaño y defectos estructurales. El número de fotorreceptores que conforman cada omatidio es variable. Magnificación de un omatidio silvestre (C, E) y un omatidio *aldB4<sup>-/-</sup>* (D,F). Los omatidios mutantes presentan defectos de integridad de la membrana de los rabdomeros (región apical del FR, flechas) y de las uniones adherentes (UA's). Los defectos en la distribución de las UA's son variables. Se observa separación de estas estructuras, así como aparición en dominios ectópicos (D,F). Magnificación de una Unión Adherente. (F) Expansión basolateral de una UA, en la que se aprecian defectos estructurales (puntos de ruptura).



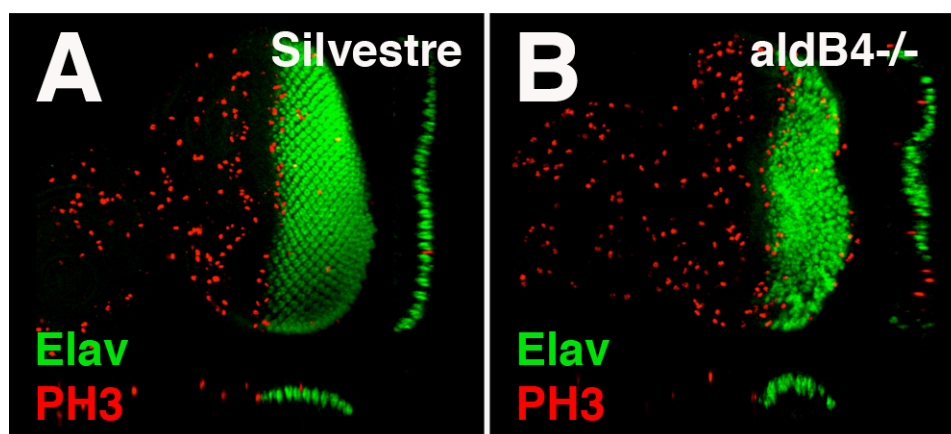
**Gráfico 3: Representación gráfica del número de fotorreceptores por omatidio en condiciones silvestres y de falta de función de *ald*.**

Los omatidios silvestres muestran un número constante de fotorreceptores (gráfico superior), mientras que en el caso de los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* es variable (gráfico inferior).

En resumen, los mutantes *aldB4* homocigóticos presentaron una desorganización de la retina con un amplio rango de defectos, observándose desde omatidios de apariencia casi normal hasta omatidios totalmente desestructurados. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que *ald* es requerido para la localización correcta de las uniones adherentes, el mantenimiento de su integridad y su restricción baso-lateral.

### 3.2.3.2.- Disco imaginal de ojo (3er estadio larvario).

En base a los defectos observados en los ojos adultos, decidimos analizar si existía alguna alteración en los discos de tercer estadio larvario que diera cuenta de los mismos. En primer lugar, comprobamos si el patrón de proliferación y diferenciación estaban alterados, al igual que habíamos observado en condiciones de sobre-expresión de *ald*. El análisis del marcador mitótico PH3 en mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>, reveló un patrón de proliferación similar al de los discos control (Fig.14). En el caso de las células neuronales marcadas por Elav, observamos una distribución irregular en el plano apico-basal de los fotorreceptores, que en condiciones silvestres están perfectamente alineados en la región apical del epitelio (Fig.14). A su vez, dado que los cortes histológicos de las retinas de adultos *aldB4*<sup>-/-</sup> revelaban que con frecuencia se reducía el número de fotorreceptores por omatidio, quisimos establecer si este defecto se debía a un fallo en su determinación, o a que éstos se eliminaban durante el desarrollo. Para ello, realizamos una tinción con el marcador pro-neural Elav y con un anticuerpo anti-Spalt, que marca de forma específica los fotorreceptores 3 y 4. En este análisis, no observamos diferencias evidentes entre los discos control y los discos *aldB4*<sup>-/-</sup>. Aunque no analizamos si la especificación de cada uno de los fotorreceptores que constituyen los omatidios estaba alterada en los mutantes para *ald*.



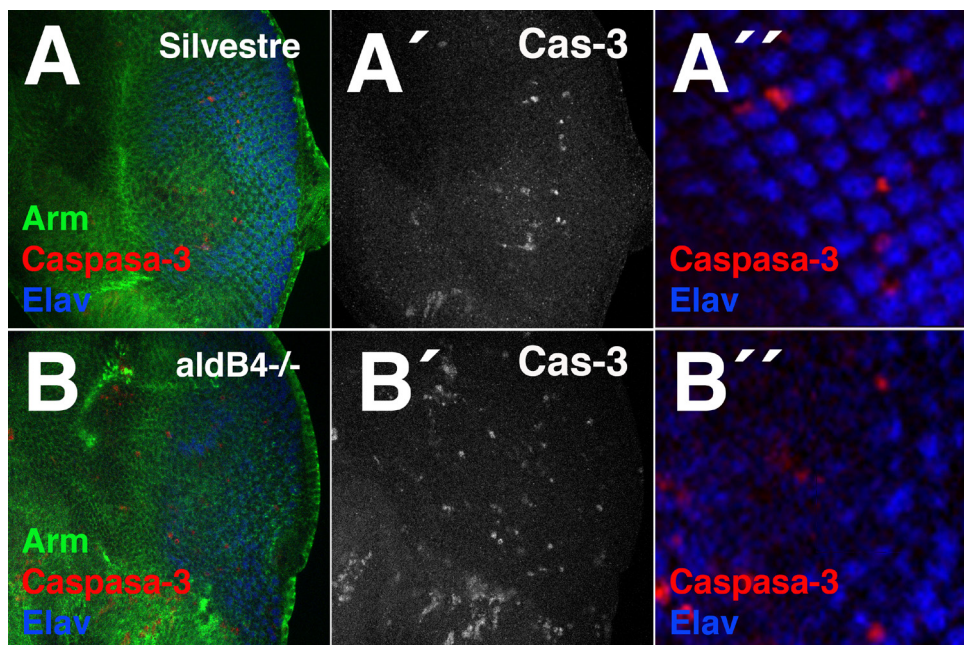
**Fig 14: La falta de función de *ald* afecta a la localización de los fotorreceptores.**

(A,B) Inmunohistoquímica frente a el marcador mitótico PH3 (rojo) y el marcador neuronal Elav (verde). Plano apical y cortes en el eje z (longitudinal (abajo) y transversal (izquierda)) de discos de ojo-antena de moscas silvestres y mutantes para *aldB4*. A diferencia de los discos control (A), los fotorreceptores en los discos mutantes (B) no se distribuyen de forma lineal, sino que se presentan a diferentes alturas (cortes en el eje z). El patrón de proliferación es similar al control.

Teniendo en cuenta que el establecimiento de los fotorreceptores no parecía afectado, decidimos analizar si la reducción del número de fotorreceptores observada en el ojo adulto se debía a un incremento de la muerte celular en este estadio. Con este fin, realizamos un marcaje, tanto de discos mutantes como de discos silvestres, con un anticuerpo que reconoce de manera específica la forma activada de la Caspasa-3, que detecta aquellas células que han activado la cascada apoptótica. En este caso, comparado con los discos control, observamos un mayor número de células Caspasa-3 positivas en los discos *aldB4*<sup>-/-</sup> (Fig.15). Este incremento es más marcado en la región anterior al surco morfo-



nético, que se corresponde con la parte más indiferenciada del disco de ojo-antena. En la región posterior al surco morfogenético, el incremento de muerte celular es sutil y no parece afectar a los fotorreceptores, ya que al igual que en los discos control, no se observa co-localización del marcador neuronal Elav y de Caspasa-3. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los fotorreceptores de los mutantes *aldB42<sup>-/-</sup>* deben ser eliminados por muerte celular durante estadios posteriores

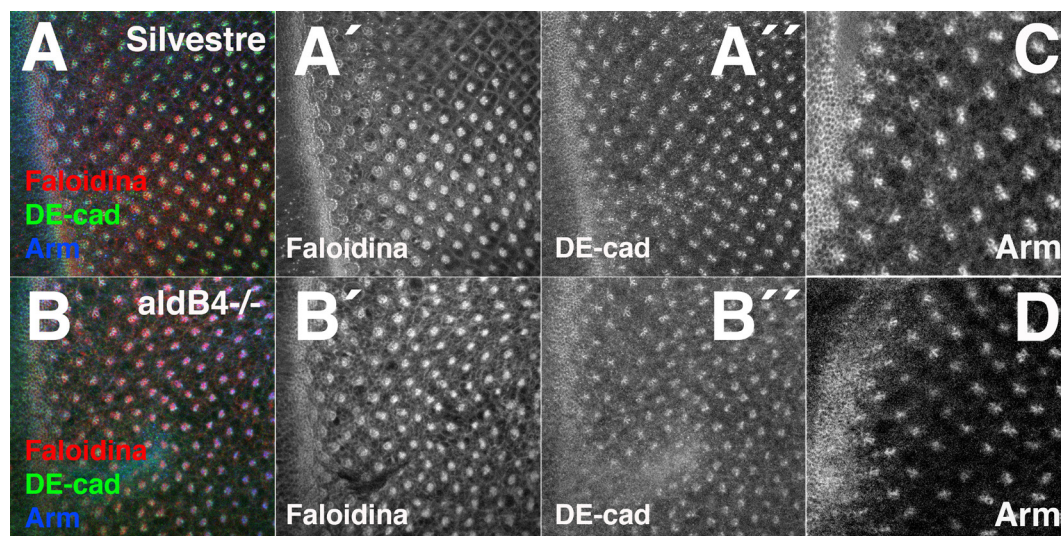


**Fig 15: El déficit de *ald* da lugar a muerte celular.**

(A,B) Discos imaginales de ojo-antena silvestre y *aldB4<sup>-/-</sup>*, teñidos para el marcador de adhesión celular Arm (verde), el marcador de muerte celular Caspasa-3 (rojo (A, A'') y gris (A')), y el marcador neuronal Elav (Azul). (A-A''). El patrón de muerte en los discos control se restringe a una banda localizada en torno a la región de la SDM. Los discos mutantes muestran mayor número de células Caspasa-3 positivas en comparación con los discos control, sobre todo en la región anterior al SM.

La definición de un epitelio requiere el correcto establecimiento y mantenimiento tanto de la adhesión celular como de la polaridad apico-basal (McCaffrey and Macara ; St Johnston and Ahringer ; Lu and Bilder 2005). Así que, considerando que nuestros resultados indican que en los ojos adultos mutantes para *ald* las uniones adherentes están afectadas, nos preguntamos si durante el desarrollo larvario la estructura epitelial estaba alterada. Para ello, teñimos discos de ojo-antena mutantes para *ald* con anticuerpos específicos contra los principales componentes de las uniones adherentes, DE-cadherina (DE-cad) y Armadillo (Arm), delimitando el contorno celular con el marcador del citoesqueleto de actina (Faloidina). Esta tinción nos permitió observar una alteración muy marcada en el patrón de distribución de los omatidios, así como defectos tanto en la localización como en los niveles de DE-cad y Arm (Fig.16). En los discos control, ambas proteínas se expresan de manera homogénea en la región del surco morfogenético, presentando un patrón altamente definido en regiones posteriores (Fig.16). Tras el surco, el epitelio se remodela, apareciendo lo que se ha denominado arcos y rosetas, que son los precursores de los grupos de fotorreceptores que conformarán los omatidios (Fig.16). Esta remodelación requiere cambios en las propiedades de adhesión, y por lo tanto, de los niveles de DE-cad y Arm (Tepass, Gruszynski-DeFeo et al. 1996;

Perez-Moreno, Jamora et al. 2003). Inicialmente, se produce un enriquecimiento de DE-cad/Arm en la membrana de las células que forman los arcos y las rosetas, pasando a restringirse a la membrana de los fotorreceptores en regiones posteriores (Blankenship, 2006) (Fig 16A,A'). En el caso de los discos mutantes para *ald*, esta remodelación tiene lugar de manera defectuosa y se observa una reducción en los niveles de DE-cad y Arm en los arcos y rosetas, afectando de manera más drástica a los fotorreceptores (Fig 16B'). Además, la localización de estas proteínas en la membrana de las células deja de ser definida y su expresión se vuelve difusa (Fig. 16B'). De la misma forma, el citoesqueleto de actina también parece estar afectado, ya que a pesar de que los niveles de expresión no parecen variar, los contornos celulares no están bien definidos (Fig. 16B, B').



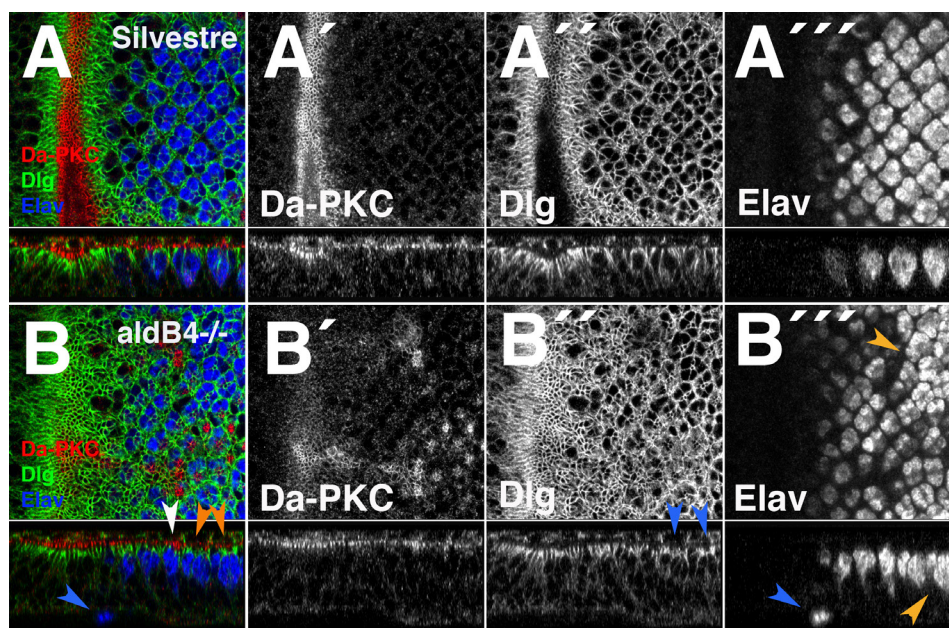
**Fig 16: Los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> presentan defectos de integridad epitelial.**

Amplificación del SM y de la región inmediatamente posterior a este. (A,B) Plano apical de un disco silvestre (A) y un disco *aldB4*<sup>-/-</sup> (B), teñidos para el marcador del citoesqueleto de actina (Faloidina (rojo)) y los marcadores de adhesión celular (DE-cad (verde) y Arm (Azul)). (A,A',A'') Los discos control muestran una organización perfecta, en la que se distingue la formación de los arcos y rosetas que preceden a los omatidios. (B,B',B'') En los discos *aldB4*<sup>-/-</sup> también se forman estas estructuras, pero se observa una desestructuración del citoesqueleto de actina (B'), así como una reducción en los niveles de DE-cad (B'). (C,D) Detalle a más aumentos de la misma región (Arm se muestra en gris).

Para analizar la estructura apico-basal del epitelio, estudiamos la expresión de Da-PKC, que se localiza en el dominio apical del epitelio, y Dlg, que se restringe a la región basolateral. Al comparar el patrón de expresión de ambas proteínas en discos *aldB4*<sup>-/-</sup> y discos control, no se apreciaron diferencias notables en los niveles de ambas proteínas, pudiéndose sólo observar una ligera reducción en los niveles de Da-PKC en los individuos mutantes (Fig. 17B,B). En cuanto a su distribución en el plano apico-basal, en la región del surco morfogénico la localización de ambas proteínas era similar a la observada en discos control. Sin embargo, a medida que nos alejamos del surco hacia regiones posteriores del disco, se aprecian diversos defectos (Fig. 17A,A', B,B'). El dominio de expresión de Da-PKC se expande basalmente en algunas células, mientras que en otras se reducen sus niveles (Fig. 20B-B'). En el caso de Dlg, sus niveles no parecen variar pero, a diferencia de los discos control que presentan una expresión en la membrana perfectamente delimitada, en los discos mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> se observa que los dominios de membrana de los fotorreceptores se fusionan (Fig. 17B'). Además, también existe un acortamiento baso-lateral del dominio de expresión de Dlg



(Fig. 17B-B''). Este acortamiento parece acorde a la reducción de tamaño que se observa en los fotorreceptores mutantes para *aldb4*<sup>-/-</sup> comparado con los discos control (Fig 17AB, AB''). En su conjunto, estos resultados sugieren que parte de los defectos observados en las retinas adultas de los mutantes *aldb4*<sup>-/-</sup> se originan durante el desarrollo larvario. Además, el hecho de que los defectos más claros se observen en la región posterior al surco morfogenético, coincidiendo con la zona donde se remodela el epitelio, nos lleva a pensar que existe un mayor requerimiento de Ald para mantener la integridad epitelial cuando se producen estos cambios estructurales.

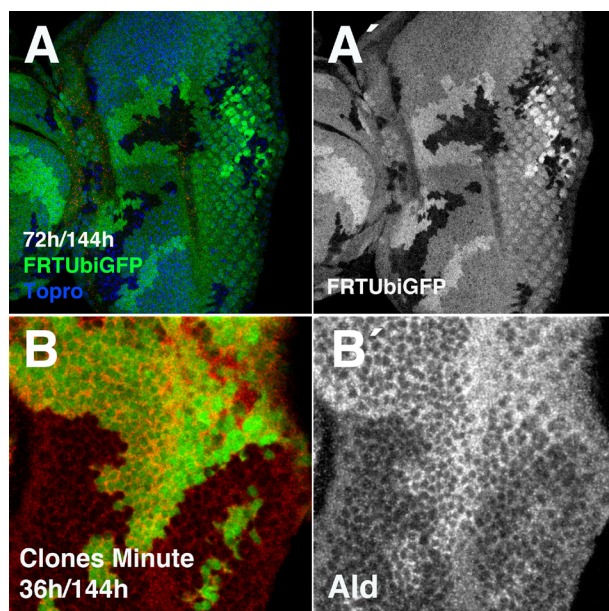


**Fig 17: Los ojos mutantes de tercer estadio larvario muestran defectos de polaridad.**

(A,B) Plano apical de la región que abarca el SM y las primeras filas de fotorreceptores de discos silvestre (A) y mutante *aldb4*<sup>-/-</sup> (B). Corte transversal (situado abajo). Los fotorreceptores se muestran en azul (Elav) y la distribución de la proteína de polaridad Da-PKC (dominio apical) y Dlg (dominio baso-lateral) en rojo y verde, respectivamente. La sección apical muestra defectos en el patrón de organización de los fotorreceptores en el plano del epitelio. En los cortes en el eje z, la localización y distribución de ambas proteínas en la región del SM es similar en el disco control y el disco mutante (comparar A-A'' y B,B''), aunque la longitud del dominio de expresión se aprecia acortada en el disco mutante. El tamaño de los núcleos de los fotorreceptores también es menor en el disco mutante (B,B''). Los niveles de Da-PKC presentes en la región apical disminuyen en la región posterior al SM, siendo más evidente en la zona más alejada de este (Flechas naranjas (B)), aunque también se puede apreciar elongación de su dominio de expresión en algunas células (flecha blanca (B)). Los dominios de membrana de Dlg parecen fusionarse, especialmente en la región más alejada del SM (flechas azules B''). Los fotorreceptores se amontonan (flechas naranjas B''), y su núcleo deja de localizarse en la región apical en estrecho contacto con la zona de expresión de Da-PKC (B), observándose ocasionalmente delaminación de los mismos (flecha azul B,B'').

En ocasiones, la confrontación de territorios mutantes con territorios silvestres permite observar efectos que no son fácilmente detectables en condiciones genéticas homogéneas, o potencia defectos ya observados. Por esta razón, llevamos a cabo un análisis clonal de falta de función para el alelo *aldb4*. De esta forma, generamos clones en el disco imaginal de ojo, tanto a 36h como a 60h tras la puesta del huevo, analizando los efectos de los mismos a las 144h. Los clones de falta de función de *aldb4* presentaron un tamaño y morfología normal, y no observamos ningún defecto notable en el epitelio del disco de ojo (Fig.18A). En cambio, al analizar los adultos resultantes de estos experimentos, diferenciamos territorios en el ojo que presentaban los mismos defectos descritos para los mutantes homocigóticos *aldb4*<sup>-/-</sup>. Así pues, el hecho de que no se aprecien defectos en los clones

*aldB4*<sup>-/-</sup> en discos de tercer estadio, pero si en los adultos, sugiere que el remanente de proteína que queda en estos clones es suficiente para suplir la insuficiencia de *ald* durante el desarrollo larvario, pero no lo es en el estadio de pupa. Estos resultados indican que los procesos morfogenéticos que tienen lugar durante el estadio pupal son más sensibles al déficit de Ald que los que tienen lugar durante el tercer estadio larvario.



**Fig 18: Los clones mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> no tienen efecto en discos de tercer estadio larvario.**

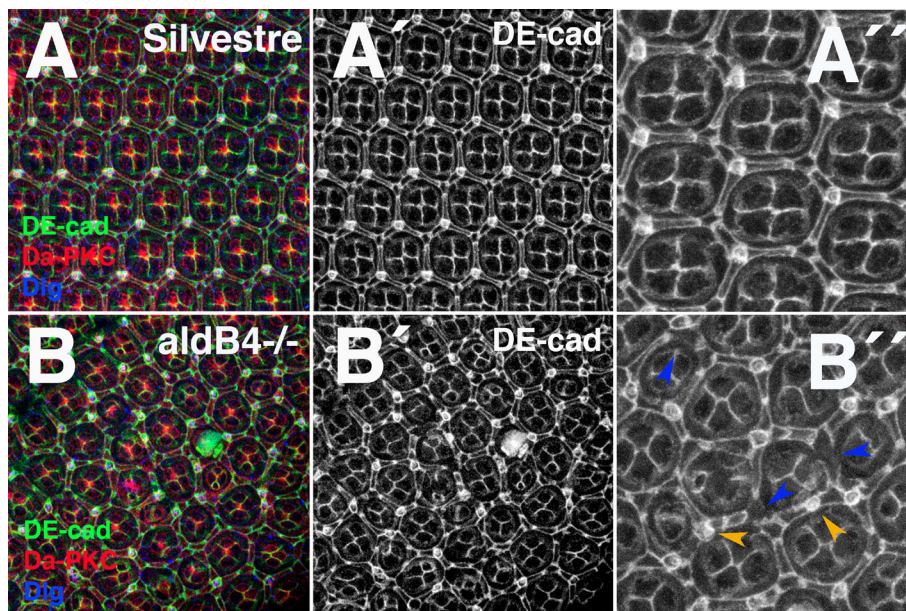
(A) Plano tangencial de un disco de ojo-antena en el que se han inducido clones por recombinación mitótica. En verde se muestra la expresión de ubi-GFP y en azul los núcleos celulares, marcados por Topro. Los niveles de GFP basales representan el tejido heterocigótico para *aldB4*, los parches con mayor intensidad marcan los clones gemelos (tejido con dos copias silvestres de *ald*) y la ausencia de GFP marca el tejido mutante homocigótico (A, A'). (B) Clones mutantes para *ald* generados en un fondo minute. Los clones están marcados por ausencia de GFP (la expresión de Ald se ha marcado en rojo). (B') Expresión de Ald. Se aprecia una clara reducción de los niveles de la proteína en el territorio que se corresponde con un clon mutante, pero no desaparece por completo.

### 3.2.3.3.- Desarrollo de la retina en estadios pupales.

Trabajos previos han mostrado que, defectos que eran sutiles o inapreciables en el epitelio del disco imaginal de ojo-antena durante el tercer estadio larvario, se hacían patentes o se potenciaban durante el desarrollo pupal (Pellikka, Tanentzapf et al. 2002), (Hong, Ackerman et al. 2003; Richard, Grawe et al. 2006). Este efecto se debe a que la reorganización celular que tiene lugar durante la morfogénesis de la retina de pupa requiere un mayor número de cambios estructurales, y por lo tanto, el correcto mantenimiento del epitelio necesita un control más preciso de los mismos (ver Introducción). Fallos en dichos mecanismos de control pueden dar lugar a múltiples defectos, entre los que se encuentran algunos de los que presentan los ojos mutantes para *ald* (Amin, Khan et al. 2009). De esta forma, dado que los defectos descritos en los discos de ojo-antena *aldB4*<sup>-/-</sup> eran relativamente débiles, analizamos si en las retinas pupales dichos defectos se veían potenciados. Para ello, realizamos tinciones para marcadores de polaridad y adhesión epitelial en retinas pupales de 48 horas tras la formación del pupario (40% APF), momento en el que ya se ha producido la rotación de los fotorreceptores (ver Introducción). Así, observamos que tanto la distribución como la morfología de los omatidios estaba alterada de manera similar a la descrita en las secciones ultrafinas de ojos adultos analizadas mediante microscopía electrónica (Fig.19). Además, encontramos que tanto el patrón de expresión de DE-cad, como el de Da-PKC o Dlg presentaba múltiples defectos (Fig. 19,20). En el caso de la DE-cad, las retinas control muestran niveles homogéneos entre las células pigmentarias, que se ven incrementados en las regiones donde se determinan las quetas (Fig. 19A-A'). En cambio, en las retinas de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> se pierde la distribución



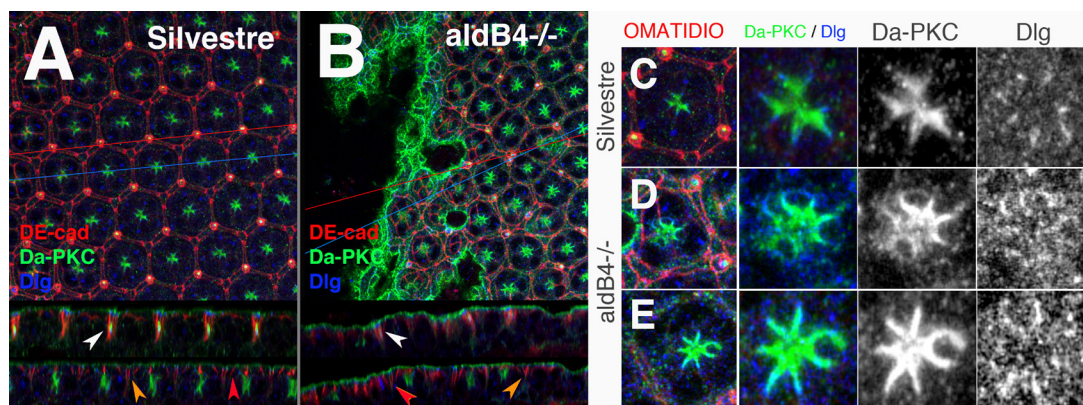
homogénea observándose una reducción e incluso desaparición de los niveles de DE-cad en un gran número de células pigmentarias (Fig. 19B-B'') Además, en algunas células también se puede apreciar un incremento de los niveles de DE-cad y aparición de dominios de expresión ectópicos (Fig 19B-B'').



**Fig 19: Las retinas pupales mutantes para *ald* muestran un alto grado de desorganización epitelial, marcada por múltiples defectos en el patrón de DE-cad.**

(A,B) Sección apical de retina de pupa, silvestre (A) y mutante *aldB4<sup>-/-</sup>* (B) teñidas para el marcador de adhesión epitelial DE-cad (verde) y los marcadores de polaridad apico-basal Da-PKC (rojo) y Dlg (azul). (A-A'') Los discos control muestran una retícula formada por omatidios perfectamente encajados. (B-B'') Los discos mutantes muestran una desorganización muy marcada del patrón de omatidios. El tamaño y número de células que componen los omatidios es muy variable. (B') El patrón de DE-cad está alterado y se observan múltiples defectos. (B'') Magnificación en la que se indican mediante flechas de colores los principales defectos. Los niveles de De-cad se pierden en células pigmentarias (flechas azules) y aparecen quetas ectópicas (flechas naranjas).

Estos defectos, también se observan en secciones tangenciales (Fig 20A,A',B,B'). Al analizar la distribución de Da-PKC y de Dlg, también detectamos alteraciones significativas en la localización de ambas proteínas. En algunos fotorreceptores se puede ver deslocalización baso-lateral de Da-PKC y aparición de dominios de membrana ectópicos (Fig 20D,E). De la misma forma, en el caso de Dlg, se observó una expansión hacia el dominio apical y solapamiento con el dominio de expresión de Da-PKC (Fig 20D,E). Por lo tanto, estos resultados muestran que durante el estadio de pupa, se potencian los defectos descritos en los discos *aldB4<sup>-/-</sup>* de tercer estadio larvario. A su vez, se detectan nuevas alteraciones, como el solapamiento del dominio de expresión de membrana de Dlg y Da-PKC, indicando que, en efecto, la reorganización tridimensional que sufren los fotorreceptores durante este estadio requiere un control más exhaustivo que la reorganización bidimensional que tiene lugar tras el paso del surco morfogénico. De manera que, en su conjunto, los resultados que hemos mostrado sugieren que la presencia de Ald es necesaria para el mantenimiento de la integridad epitelial durante el desarrollo del ojo, existiendo un requerimiento especial durante las fases que conllevan remodelación del epitelio.



**Fig 20: Las retinas pupales mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> presentan defectos de polaridad apico-basal.**

(A,B) Sección apical de retinas de pupa silvestre (A), y mutante *aldB4*<sup>-/-</sup> (B). La línea de corte que se corresponde con los cortes transversales situados en la región inferior esta marcada en rojo (quetas), corte superior y en azul (región central del omatidio), el corte inferior. El marcador de adhesión celular DE-cad se muestra en rojo, Da-PKC en verde y Dlg en azul. El patrón de omatidios es irregular en la retina mutante y se aprecian desniveles (detectados por la falta de tinción en determinadas regiones del plano apical y por la desigualdad del perfil en los cortes transversales). La estructura de las quetas esta alterada (flecha blanca), al igual que los dominios de expresión de DE-cad (flecha naranja). Las quetas en los cortes de la retina control muestran un enriquecimiento de Da-PKC en la región central y altos niveles de DE-cad en la región externa. En las quetas mutantes es difícil distinguir el acúmulo de Da-PKC y la expresión de DE-cad no presenta la definición que se aprecia en el control. Los dominios de expresión de DE-cad en las células pigmentarias mutantes, se visualizan acortados (flecha naranja) o elongados (flechas rojas) existiendo zonas en las que se aglutinan, a diferencia del control, en el que presentan una distancia homogénea y estereotipada (flechas rojas).

### 3.2.4) Análisis fenotípico de la falta de función de *ald* durante el desarrollo del ala

#### 3.2.4.1.- *Ala adulta.*

Las alas adultas de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> presentaron fenotipos variables, apreciándose fundamentalmente defectos sutiles de aposición de la superficie dorsal y ventral, evidenciados por un aspecto granular de la superficie del ala y una alteración del patrón de pelos del ala (Fig.21B).



**Fig 21: Fenotipo de ala adulta de mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>.**

(A) Ala adulta de un individuo silvestre. (B) Ala adulta mutante *aldB4*<sup>-/-</sup>. Estas alas muestran muescas en el borde del ala, defectos en las venas y aspecto granular. (C) Ala adulta *en-Gal4>UASald*<sup>ARNi</sup>. Las alas mutantes para *aldB4* muestran muescas en el borde del ala, defectos en las venas y aspecto granular. El efecto de la expresión del ARNi en el compartimento posterior del ala, es similar al fenotipo de las alas *aldB4*<sup>-/-</sup>. Cabe destacar que el tamaño final del ala, en el caso de la reducción de los niveles de *Ald* mediante la expresión de su ARNi, da lugar a alas de menor tamaño que las mutantes.

Cabe destacar que en ningún caso observamos ampollas que indicasen que los epitelios no se han apuesto correctamente. El borde del ala presentaba varias muescas, que mayoritariamente se

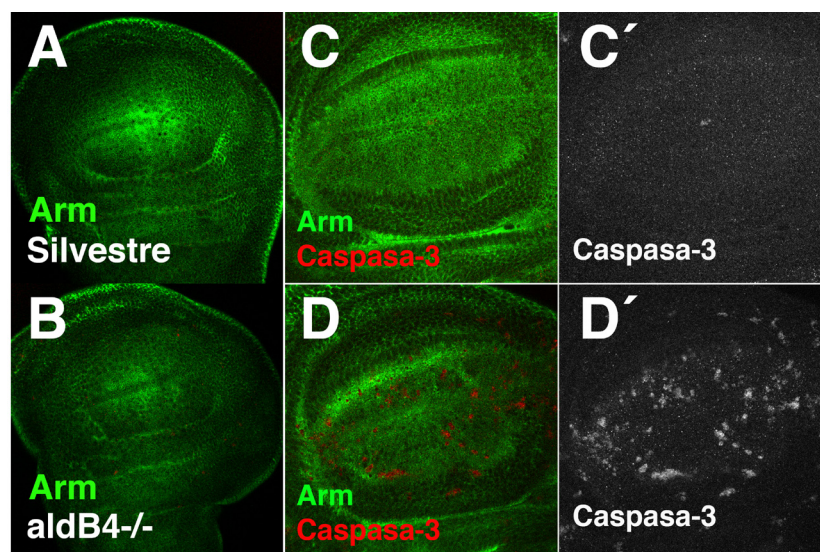


localizaban en la región donde la vena cinco se fusiona con el margen del ala (Fig.21B). También se observó un fenotipo leve de aparición de extravenas (Fig.21B). Además, se cuantificó que existía una reducción del 21% del tamaño del área del ala y una reducción del 11% del tamaño celular en los individuos mutantes. De este modo, considerando la reducción en el tamaño celular, estimamos que el número total de células que forman parte de estas alas es un 13% menor que en el caso de alas silvestres.

La expresión del ARN-i de *ald* en el compartimento posterior del ala utilizando la línea *en-Gal4* da lugar a alas adultas cuyo fenotipo es similar al de los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* (Fig.21B,C). Sin embargo, cuando el ARN-i se expresa en homocigosis, a 25°C es letal en estadio de pupa, mientras que a 29°C es letal embrionario.

#### 3.2.4.2.- Disco imaginal de ala.

Dados los defectos observados en las alas adultas de los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>*, decidimos llevar a cabo un análisis similar al realizado en el ojo para comprobar si la falta de función de *ald* afectaba a los mismos procesos en diferentes órganos. Tal y como acabamos de exponer, las alas mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* son de menor tamaño que las alas control, efecto que se debe parcialmente a una reducción en el número de células que las componen. De la misma forma, la región de los discos mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* que dará lugar al ala adulta también muestra un tamaño reducido (Fig. 22A,B).



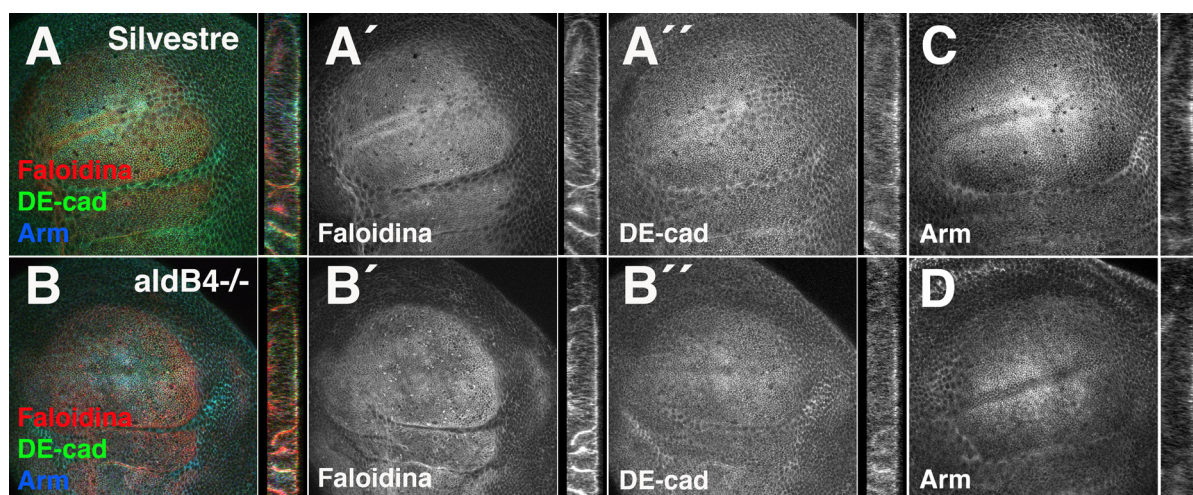
**Fig 22: Los discos imaginales de ala de tercer estadio larvario mutantes para *ald* muestran un tamaño reducido e incremento de muerte celular.**

Plano tangencial de un disco silvestre (A) y un disco mutante *aldB4<sup>-/-</sup>* (B). El epitelio se ha teñido con anti-Arm (verde). La región presuntiva de ala de los discos mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* presenta menor tamaño que la misma región del disco control. (C,D) Magnificación del plano basal de los discos mostrados en la imagen A y B, en la que se muestra el patrón de muerte celular, determinado por el marcaje frente a Caspasa-3 (rojo). El disco silvestre no muestra tinción para el marcador de muerte celular (C,C'), mientras que los discos mutantes para Ald presentan un elevado número de células Caspasa-3 positivas (D,D').

Teniendo en cuenta que una reducción del número de células puede ser ocasionada por un déficit proliferativo y/o un incremento de la muerte celular, decidimos analizar ambos parámetros. Al igual que sucedía en el disco de ojo, el patrón de proliferación, analizado con anti-PH3, no pa-

recía estar alterado sustancialmente durante el desarrollo de los discos mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. En cambio, sí que observamos un incremento en el número de células apoptóticas (células positivas para Caspasa-3) (Fig.22C,C',D,D'). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que la disminución del número de células observada en las alas adultas de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> se debe fundamentalmente a la eliminación de las mismas durante el desarrollo por muerte celular.

Siguiendo la lógica del análisis llevado hasta el momento, estudiamos si la integridad epitelial se encontraba afectada en estos discos. Para ello, realizamos tinciones específicas para el marcador del citoesqueleto de actina (faloidina), y los marcadores DE-cad, Arm, y marcadores de polaridad apico-basal. En los discos mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> el citoesqueleto de actina no parecía estar afectado (Fig. 23A,A',B,B'). En cambio, sí que observamos una reducción de los niveles de expresión de DE-cad y Arm (Fig.23 A,A',A'',A'',C,D).

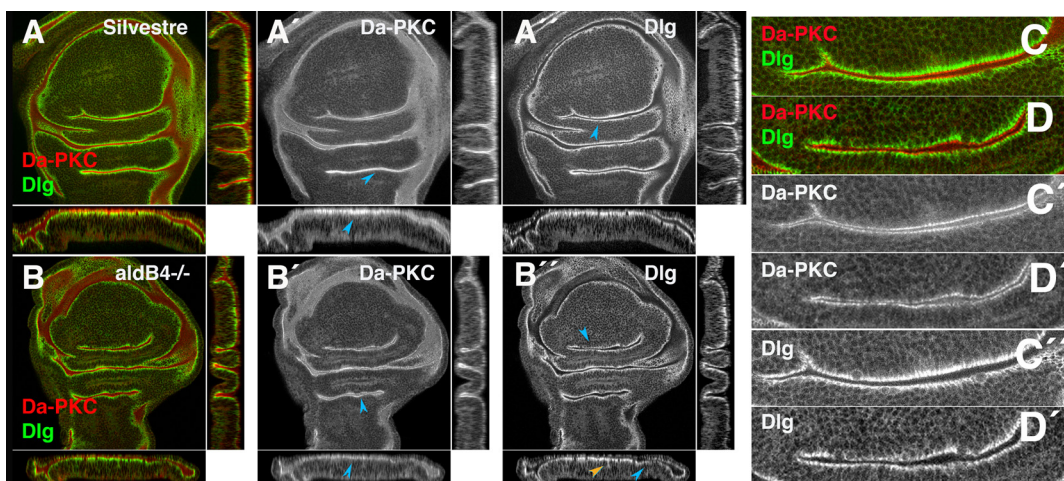


**Fig 23: Los discos imaginales de ala de tercer estadio larvario mutantes para *ald* muestran defectos de adhesión celular.**

Plano tangencial de la región presuntiva de ala de un disco silvestre (A) y un disco *aldB4*<sup>-/-</sup> (B). Corte longitudinal situado a la dcha. El citoesqueleto de actina se ha marcado en rojo (faloidina) y los marcadores de adhesión celular DE-cad y Arm, en verde y azul respectivamente. (A',B') No se observan diferencias marcadas en la integridad del citoesqueleto de actina entre el disco control y el disco mutante *aldB4*<sup>-/-</sup>. Los niveles de DE-cad (A'',B'') y Arm (C,D) se encuentran reducidos en los discos mutantes.

En el caso de los marcadores de polaridad apico-basal, también observamos una reducción en los niveles de Da-PKC, efecto especialmente evidente en los pliegues del epitelio o en los cortes transversales (Fig. 24A,A',B,B'). En el caso de Dlg, resulta difícil establecer si los niveles de la proteína están afectados como ocurre con Da-PKC. En los cortes transversales no se aprecia una reducción clara de los niveles (Fig. 24A,A',B,B'), aunque al analizar la región de los pliegues a más aumento, parece que la presencia de la proteína en la membrana de las células sí está reducida (Fig.24 C,C',D,D'). Además, a diferencia de lo que ocurre en los discos control en los que la distribución de Da-PKC y Dlg es homogénea, en los discos mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> el patrón de expresión de estas proteínas es discontinuo e irregular (Fig.24). Por lo tanto, al igual que ocurre en el ojo, los niveles de DE-cad, Arm y Da-PKC se reducen en condiciones mutantes para *ald* y se observan defectos en la distribución de las mismas, así como de Dlg.

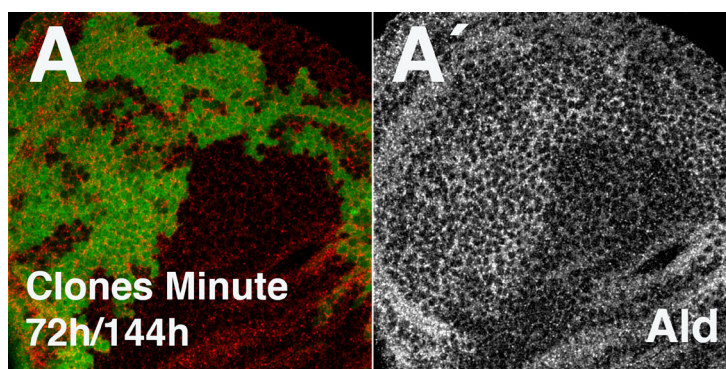




**Fig 24:** Los discos imaginales de ala de tercer estadio larvario mutantes para *ald* presentan una morfología alterada y defectos de polaridad.

Plano tangencial y corte longitudinal (situado a la dcha) y transversal (situado abajo) de un disco de ala silvestre (A) y un disco mutante *aldB4*<sup>-/-</sup> (B). El epitelio se ha marcado con anti-Da-PKC en rojo y anti-Dlg en verde. (A',B') Los niveles de Da-PKC se encuentran reducidos en los discos *aldB4*<sup>-/-</sup>. (A'',B'') Los niveles de Dlg no parecen variar, aunque se observa elongación de su dominio de expresión (flecha naranja) o acortamiento (flechas azules). (C-C'',D,D'') Magnificación de un pliegue del tejido en la que se puede ver la región apical del epitelio localizada en el centro del pliegue y la región basolateral localizada hacia fuera. (C) Pliegue del epitelio silvestre. (D) Pliegue del epitelio mutante *aldB4*<sup>-/-</sup>. Los niveles y la distribución tanto de Da-PKC como de Dlg son homogéneos en el pliegue control (C-C''), mientras que el pliegue mutante muestra expresión en desigual y más difusa (D-D'').

Para tratar de establecer si la expresión en parches discretos de tejidos nos permitía visualizar mejor los defectos ocasionados por la falta de función de *ald*, generamos clones mutantes del alelo *aldB4* (ver Materiales y Métodos).



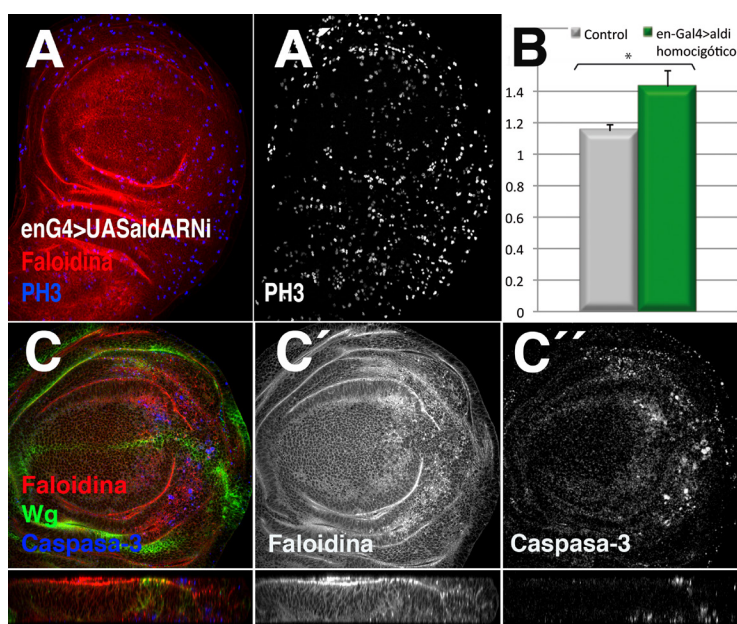
**Fig 25:** Los clones mutantes para *ald* no eliminan Ald por completo en el disco imaginal de ala

(A-A') Sección tangencial de un disco de tercer estadio larvario en el que se han inducido clones *aldB4* Minute+ en un fondo Minute heterocigótico de manera que las células mutantes para *ald* tienen una ventaja proliferativa. Los clones están marcados por ausencia de GFP (A) y los niveles de Ald están marcados en rojo (A) y gris (A'). (A') Los niveles de Ald se reducen de manera notable en el clon mutante, pero la proteína no desaparece.

En este caso, al igual que sucedía en el ojo, los clones de falta de función de *ald* tampoco presentaron defectos evidentes en el tercer estadio larvario. No obstan-

te, a diferencia de lo que ocurría con los clones en el ojo adulto, en las alas adultas no observamos ninguna diferencia morfológica. Efecto que, al igual que sugerimos en el caso del disco imaginal de ojo, creemos que podría ser debido a que remanente de proteína que queda en estas células es suficiente para llevar a cabo gran parte de la función de esta quinasa (Fig.25). Además, este resultado sugiere que el requerimiento de Ald durante la morfogénesis del ojo parece ser más restrictivo que en el caso del ala.

Teniendo en cuenta la debilidad de fenotipos observada al inducir clones de falta de función de *ald*, y dado que previamente habíamos comprobado que al eliminar la función de este gen mediante un ARN-i específico encontrábamos fenotipos más drásticos que los observados en los mutantes homocigóticos, decidimos utilizar esta técnica para estudiar los efectos producidos por una insuficiencia para *ald*. Para ello, analizamos en discos *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARN-i</sup>* homocigóticos, los parámetros que previamente habíamos estudiado en la condición mutante *aldB4<sup>-/-</sup>*.



**Fig 26: La reducción de los niveles de Ald, mediada por la expresión de su ARNi, incrementa el número de células en mitosis, genera cambios en el citoesqueleto de actina e induce muerte celular.**

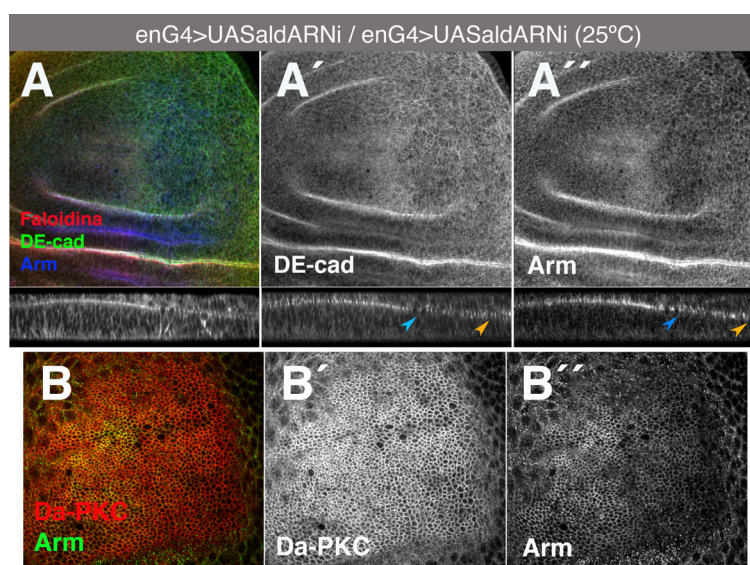
(A-A') Plano medio de un disco de ala de tercer estadio larvario en el que se ha expresado el ARNi de *ald* en el compartimento posterior (*enG4>UASald<sup>ARN-i</sup>/enG4>UASald<sup>ARN-i</sup>* (25°C)). El epitelio se ha marcado con Faloidina que revela el citoesqueleto de actina (rojo) y el patrón de proliferación con el marcador de mitosis PH3 (azul A, y gris A'). (A') Incremento del número de células PH3 positivas en el compartimento posterior del disco, donde se ha eliminado Ald. (B) En el gráfico se muestra la relación de células PH3 positivas del compartimento posterior con respecto del anterior (CP/CA). El incremento que se observa es significativo ( $p < 0.05$ ) (C-C'') Plano medio de un disco de ala de tercer estadio larvario (*en-G4>UASald<sup>ARN-i</sup>/en-G4>UASald<sup>ARN-i</sup>* (25°C)) y el corte transversal del mismo (región inferior). El citoesqueleto de actina se muestra en rojo, el área presuntiva de ala se delimita con anti-Wg (verde), y la actividad de la vía apoptótica se ha detectado tiñendo para Caspasa-3 (azul). (B,B') El compartimento posterior muestra desorganización del citoesqueleto de actina (acúmulos dispersos). En el corte transversal se aprecia cambios de la morfología celular. (B,B'') Parte de las células del compartimento posterior activan el programa apoptótico. (B) Se aprecia una expansión del dominio de expresión de Wg.

En primer lugar, realizamos un marcaje frente a PH3, y comprobamos que, a diferencia de lo que ocurría en los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>*, los discos *en-Gal4>UAS-aldARN-i/en-Gal4>UAS-ald<sup>ARN-i</sup>*



mostraron un incremento significativo del número de células PH3 positivas en el compartimento posterior (Fig. 26 A-B). Así mismo, cuando se analizó el patrón de Caspasa-3, se apreciaron grupos de células que habían activado la vía apoptótica en el territorio en el que se habían reducido los niveles de *Ald* (Fig 26C,C'). Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que la disminución del número de células observada en las alas adultas puede deberse a un proceso de muerte celular.

En cuanto a integridad epitelial, también observamos una potenciación de los fenotipos descritos con anterioridad en discos mutantes para *ald*. Para este análisis, marcamos el citoesqueleto de actina para observar la morfología celular, en combinación con DE-cad/Arm y/o Da-PKC/Dlg. Al analizar el plano apical del epitelio en discos *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>* observamos que las células del compartimento posterior presentaban un claro incremento del diámetro celular en comparación con el de las células del territorio silvestre (Fig. 27).

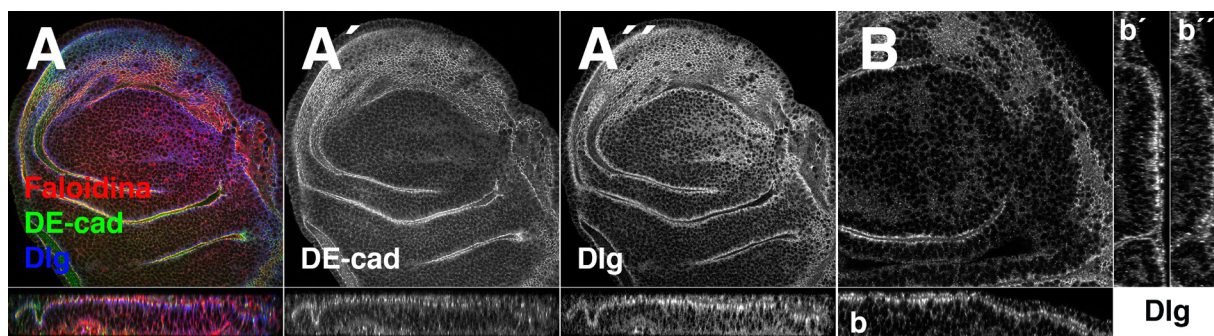


**Fig 27: La expresión ectópica del ARNi de *ald* induce pérdida de adhesión celular.**

(A) Sección apical y corte transversal (parte inferior) de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *enG4>UASald<sup>ARNi</sup>/enG4>UASald<sup>ARNi</sup>* (25°C). La morfología celular se pone de manifiesto por el marcador del citoesqueleto de actina Faloidina, (rojo y gris en la sección transversal). Los marcadores de adhesión celular DE-cad y Arm se muestran en verde y azul respectivamente. En la sección apical se aprecia reducción de los niveles de DE-cad (A') y Arm (A'') en el compartimento posterior, siendo más acentuado el efecto sobre Arm. En el corte transversal se puede ver como las células del compartimento posterior cambian su morfología, efecto especialmente evidente en las células de la membrana peripodial. Las células de la membrana peripodial son aplanadas y se presentan en hilera en la región control, mientras que las células que presentan reducidos niveles de Ald se vuelven cuboidales y se intercalan, perdiéndose la estructura característica del epitelio. En la región en la que las células modifican su morfología se aprecia desde pérdida de DE-cad (A') y Arm (A'') (Flechas azules) a elongación de su dominio de expresión en la membrana (flechas naranjas). (B-B'') Magnificación del plano apical de la región presuntiva de un disco de ala de tercer estadio larvario del genotipo *enG4>UASald<sup>ARNi</sup>/enG4>UASald<sup>ARNi</sup>* (25°C). En rojo se muestra la expresión del marcador de polaridad apical Da-PKC (gris en (B)) y en verde Arm (Gris en (B')). Las células del compartimento posterior incrementan su superficie apical, sin afectar a los niveles de DA-PKC. En cambio, se observa una reducción muy marcada en los niveles de Arm.

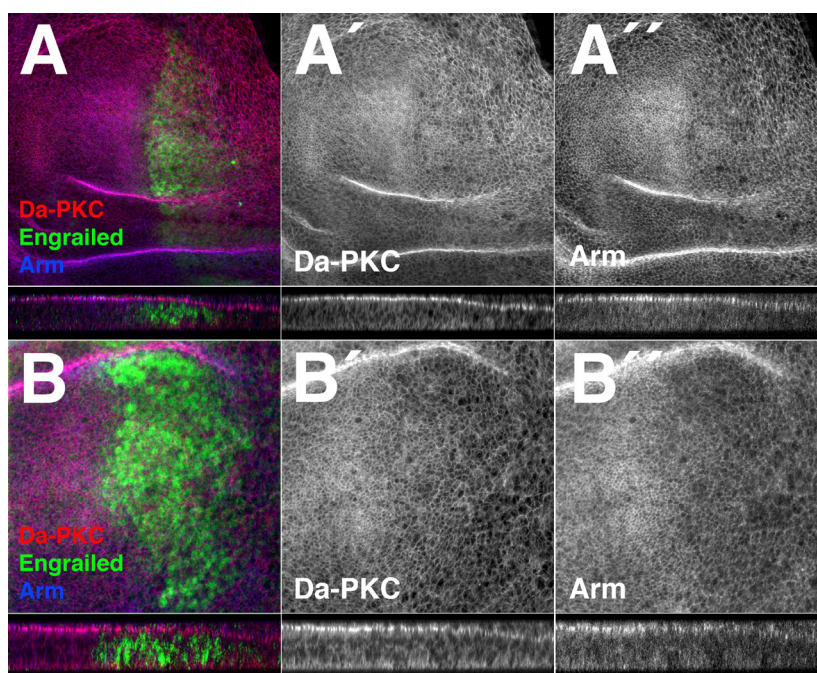
El análisis de cortes transversales de estos discos mostró que también existía desorganización del epitelio en el compartimento posterior, apreciándose acúmulos anómalos de actina (Fig. 27A). Así mismo, el epitelio de la membrana peripodial también estaba desestructurado, observándose una elongación de las células, que ocasionalmente llegaban a intercalarse y formar acúmulos celulares

(Fig. 27A). Además de la desorganización epitelial descrita, el compartimento posterior de estos discos presentaba defectos de adhesión celular, ya que se apreciaba una clara bajada de los niveles de DE-cad y Arm en el plano apical del epitelio (Fig. 27). En los cortes transversales el efecto observado era variable, visualizándose desde una reducción o desaparición de los niveles de estas proteínas en las uniones adherentes, hasta una expansión de su dominio de expresión en la membrana (Fig. 27A-A'' y Fig 27A,A').



**Fig 28 : La reducción de los niveles de Ald no afecta sustancialmente los niveles de expresión de Dlg.**

(A) Sección sub-apical y corte transversal (parte inferior) de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo  $enG4>UASald^{ARNi}/enG4>UASald^{ARNi}$  (25°C). La tinción para faloidina marca el citoesqueleto de actina (rojo), DE-cad se muestra en verde y Dlg en azul. Se observa como se reducen los niveles de DE-cad en el compartimento posterior, mientras que en la misma zona los niveles de Dlg no parecen alterarse. (B) Magnificación del disco imaginal de ala en el que se muestra una ligera reducción de los niveles de expresión de Dlg (gris). (b) Corte transversal. (b') Corte longitudinal del compartimento anterior. (b'') Corte longitudinal del compartimento posterior.



**Fig 29: La reducción de los niveles de Ald ejerce un doble efecto sobre el dominio de expresión de Da-PKC y Arm.**

(A,B) Plano apical y corte transversal (región inferior) de discos imaginales de ala de tercer estadio larvario del genotipo  $enG4>UASald^{ARNi}/enG4>UASald^{ARNi}$  (25°C). La zona en la que se elimina Ald está marcada por la presencia de engrailed (verde), la expresión del marcador del dominio apical Da-PKC se muestra en rojo (gris A',B y la expresión de Arm en azul y gris (A'',B')). (A') El corte transversal muestra una elongación del dominio de expresión de Da-PKC, sin afectar de manera sustancial los niveles de la proteína. En cambio, en el panel inferior (B'), los niveles de Da-PKC se ven claramente reducidos. (A'',B'') El efecto sobre Arm es similar, aunque en el caso de esta proteína siempre se observa reducción de sus niveles.

En cuanto a los marcadores de polaridad, ni los niveles de Da-PKC ni de Dlg parecían afectados en secciones apicales del disco (Fig. 27B,B'/28A,A''/29,A,B,A'',B'), pero al analizar su expresión en cortes tangenciales, se apreciaba una ligera disminución de sus niveles, siendo más marcado para Da-PKC (Fig. 28,29). Además, en el caso de Da-PKC, en ocasiones observamos deslocalización



baso-lateral (Fig. 29B,B'). Por lo tanto, estos datos sugieren que el requerimiento de *ald* para el correcto establecimiento y mantenimiento de la integridad epitelial es general.

### 3.2.5) Defectos fisiológicos.

Además de los defectos morfológicos mencionados en el apartado anterior, estos mutantes mostraban otro tipo de afecciones fisiológicas. Las moscas *aldB42<sup>-/-</sup>* presentaban un retraso en el desarrollo y de media requerían 24-48h más para completar su desarrollo (esto se puede aplicar a las hembras, ya que casi no se obtuvieron machos adultos *aldB4* homocigóticos).

Las moscas que llegaban a eclosionar presentaban defectos de locomoción en grado variable y los síntomas solían empeorar con el paso del tiempo. En algunos casos, los movimientos de los mutantes no diferían mucho de los de las moscas control; en otros, se apreciaban movimientos lentos y desorganizados, incapacidad para volar e incluso parálisis generalizada. De hecho, la parálisis parece ser la responsable de que los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* no sean capaces de eclosionar y mueran en el pupario. Además, también presentaron viabilidad reducida, ya que mueren entre las 24 y 96h horas siguientes a la eclosión, en el caso de las hembras, y antes de las 48h en el caso de los machos (25°C).

### 3.2.6) Efecto de la contribución materna.

A pesar de que estudios previos con el alelo *aldMps1* establecieron que el efecto materno no afectaba al fenotipo de letalidad tardía observado para los mutantes homocigóticos, decidimos analizar si ocurría lo mismo para el alelo *aldB4*.

Para eliminar la contribución materna y zigótica al mismo tiempo, cruzamos machos y hembras homocigóticos para *aldB4<sup>-/-</sup>*. A pesar de que estas moscas presentaban una fertilidad reducida, se obtuvo progenie de dicho cruce, observándose huevos necrotizados que no sobrepasaban la fase embrionaria o larvaria temprana (L1). Esta diferencia de resultados con trabajos previos (Fischer, Heeger et al. 2004), puede ser debida a las distintas técnicas utilizadas para el estudio y/o a las variaciones existentes entre los alelos mutantes. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que, en el caso del alelo *aldB4*, el efecto materno sí es relevante, ya que cuando es eliminado, los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* no superan las primeras fases del desarrollo.

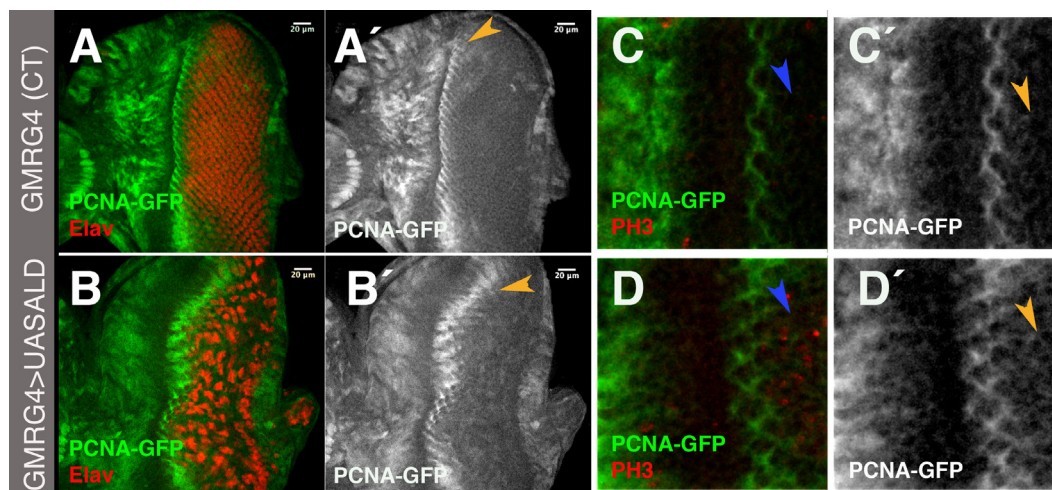
## 3.3.- Caracterización fenotípica de los efectos producidos por la sobre-expresión de *ald* durante el desarrollo del ojo y ala

En combinación con *GMR-Gal4*, la línea *EP-M50.2* es letal en estadio de pupa temprana; en cuanto al disco imaginal de ojo-antena, se observa una alteración de la distribución y localización de los fotorreceptores y un incremento muy significativo del marcaje de PH3 (Fig.3). De manera que para completar la caracterización fenotípica de *ald*, y considerando que este gen se seleccionó por su fenotipo de sobre-expresión, estudiamos los efectos producidos cuando *ald* es sobre-expresado.

### 3.3.1) Efecto de la sobre-expresión de *ald* en el control de la proliferación celular.

En primer lugar, quisimos analizar las posibles causas del marcado incremento de PH3 observado en los discos *GMR-Gal4>EP-M50.2*. Teniendo en cuenta los datos existentes en la bibliografía acerca de *ald*, el efecto observado podría deberse a una detención de las células en mitosis (Fischer, Heeger et al. 2004). Aunque, a su vez, el elevado número de células positivas para PH3

sugería que, independientemente de la posible detención en mitosis, un mayor número de células estaba entrando en división. Para tratar de establecer si esto era lo que estaba ocurriendo, realizamos un estudio utilizando diferentes marcadores del ciclo celular. En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de PCNA, gen cuya transcripción se activa cuando las células van a entrar en la fase S del ciclo. Para medir los niveles de activación de PCNA, expresamos una construcción que contiene la región promotora de PCNA unida al gen reportero GFP.

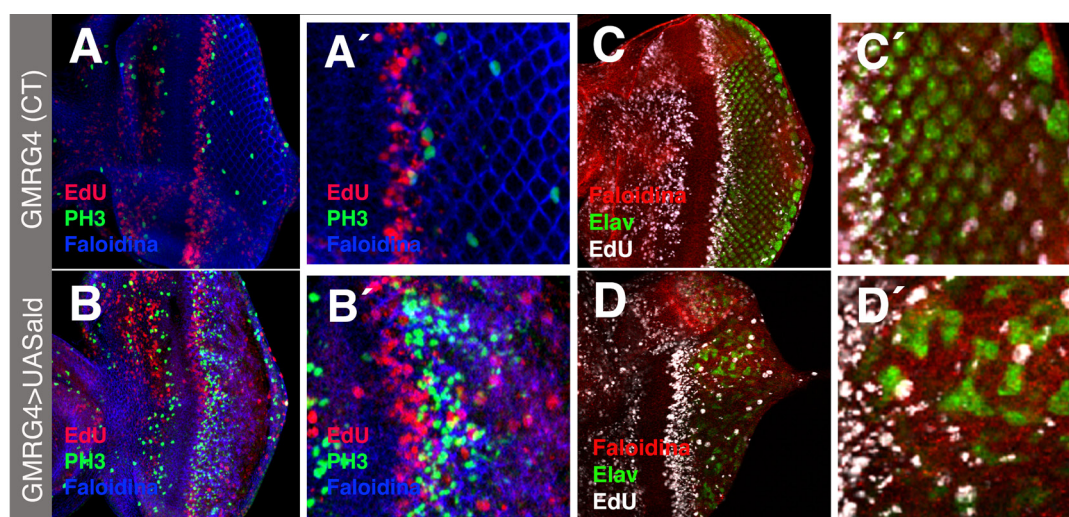


**Fig30: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal en la región posterior al surco morfogenético (SM) produce un incremento transcripcional de PCNA.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de tercer estadio larvario *GMRGal4/PCNA-GFP* (control) (B) Plano apical de un disco *GMRGal4>UASald/PCNA-GFP*. PCNA-GFP es una construcción que contiene la región promotora del gen acoplada al gen reportero GFP. Los núcleos de los fotorreceptores están teñidos en rojo (Elav). La expresión transcripcional de PCNA, se mide en base a los niveles de la proteína GFP (verde A,-D y gris A',-D'). En el disco control la expresión de PCNA detrás del SM se restringe a una banda estrecha de células (flecha en A'). En cambio, el disco que sobre-expresa *ald* presenta una banda de mayor grosor y mantiene niveles intermedios en zonas posteriores (flecha en B,B'). (C,D) Detalle a más aumento del SM y de la región inmediatamente posterior al mismo., En los discos *GMRGal4>UASald/PCNA-GFP* existe un acúmulo de células PH3 positivas (rojo) (flecha azul en D y D'), que presentan niveles intermedios de expresión de PCNA en la región posterior al SM (flecha naranja en D'). En cambio, en el control no se observan células en división (flecha azul en C,C') y se ha perdido totalmente la expresión de PCNA (flecha naranja en C).

De esta forma, observamos que los discos control presentaban un pico de expresión en la región inmediatamente posterior al surco morfogenético que abarcaba de 2 a 3 diámetros celulares, precediendo la zona de la segunda oleada mitótica (Fig. 30A,A',C,C'). En el caso de los discos *GMRGal4>EP-M50.2*, este pico de activación fue mayor, comprendiendo de 5 a 6 diámetros celulares. Además, a diferencia del control, en el que la expresión de PCNA prácticamente desaparece tras el pico de activación, estos discos mantienen niveles intermedios en dichas regiones (Fig. 30B,B',D,D'). En segundo lugar, analizamos la incorporación de EdU, análogo de la uridina que se integra en el ADN de nueva síntesis. En este caso, el resultado fue similar al descrito para PCNA. Comparando discos *GMR-Gal4* con discos *GMR-Gal4>EP-M50.2*, observamos un mayor número de células marcadas con EdU en la región inmediatamente posterior al surco morfogenético, así como en la banda de células marcadas con anti-PH3 (Fig.31A-B). También analizamos la expresión de Ciclina E (CycE) y Ciclina B (CycB), proteínas necesarias para la transición de las fases G1-S y G2-M respectivamente. En el caso de la CycE, también se observa un marcado incremento tras el

surco morfogenético en los discos en los que *ald* es sobre-expresado, similar al efecto descrito para PCNA-GFP y EdU. Sin embargo, en el caso de la CycB, apreciamos un incremento generalizado de los niveles de la proteína en la región posterior al surco morfogenético (datos no mostrados), sin disminución de los mismos en regiones posteriores. Este dato concuerda con publicaciones previas que asignan a *ald* una función como inhibidor de la degradación de la CycB (Gilliland, Wayson et al. 2005). Dado el incremento observado para los distintos marcadores analizados, estos resultados apoyan la idea de que la sobre-expresión de *ald*, de forma directa o indirecta, fuerza a un mayor número de células a entrar en ciclo. A su vez, el hecho de que existan células PCNA, EdU y CycE positivas en la región del incremento de PH3, sugiere que las células no están detenidas en mitosis. De hecho, la reducción en la relación de células EdU/PH3 positivas apunta a que existe un retraso en la salida de mitosis, como previamente habíamos sugerido. Por otro lado, el doble marcaje para EdU y el marcador neuronal Elav nos permitió comprobar que las células diferenciadas no estaban ciclando (Fig31C-D), por lo que parece que la activación de *ald* únicamente es capaz de forzar la entrada en ciclo de células receptoras.



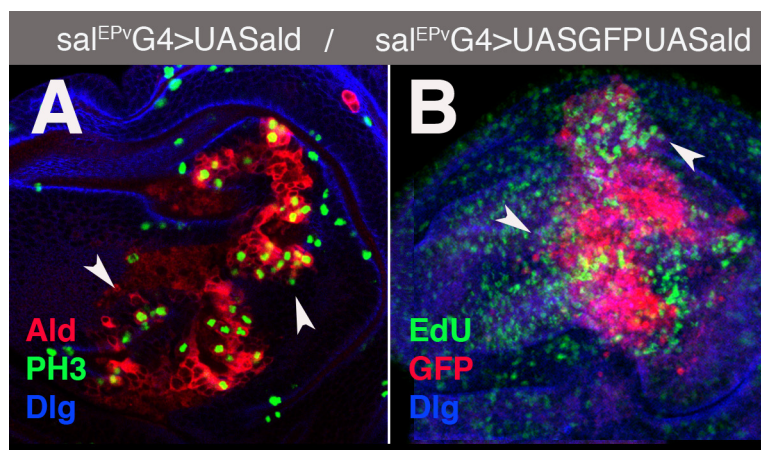
**Fig 31: La sobre-expresión de *ald* en la región posterior al surco morfogenético (SM) incrementa el número de células que entran en división y retrasa la salida de Mitosis.**

(A) Plano tangencial de un disco *GMRG4* control. (B) Plano tangencial de un disco *GMRG4>UASald*. (A',B') Magnificación de A y B. La fase de síntesis “de novo” (fase S) esta marcada por el reactivo EdU (rojo). La fase M (mitosis) se distingue por la presencia de PH3 (verde). El marcaje del citoesqueleto de actina (azul) permite tener una referencia física de las diferentes regiones del disco. El disco control muestra incorporación de EdU en una franja definida, en la región inmediatamente posterior al SM (A,A'). Justo después, unas pocas células se marcan con PH3 (A,A'). Los discos *GMRG4>UASald* muestran mayor densidad de células EdU positivas en la franja inmediatamente posterior al SM (B;B') y, a diferencia del control, las células siguen incorporando EdU en zonas alejadas de este (B'). El número de células positivas para PH3 también se incrementa notablemente. (C-D) Distribución de imágenes análoga a (A-B). Los fotorreceptores, marcados en verde (Elav) no incorporan EdU.

En base a los resultados que acabamos de exponer, y teniendo en cuenta que la función de *ald* como regulador de la progresión de la mitosis está ampliamente conservada, nos preguntamos si la capacidad de forzar a un mayor número de células a entrar en división era un efecto restringido al epitelio del disco imaginal de ojo o era un efecto general. Para testar esta hipótesis, analizamos si en otras estructuras epiteliales como es el caso del ala, la sobre-expresión de *ald* producía el mismo efecto. De esta forma, expresamos *ald* utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4* y comprobamos que, al igual



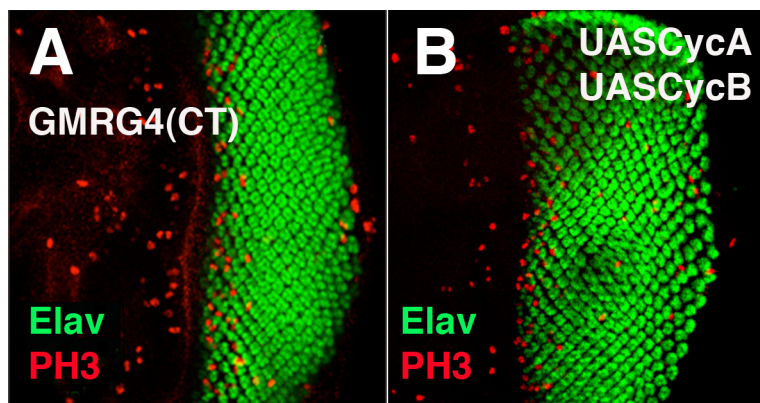
que ocurre en el disco imaginal de ojo, la sobre-expresión de *ald* produce un incremento en el marcaje de PH3 (Fig. 32A). De la misma forma, observamos un incremento en la incorporación de EdU (Fig. 32B), confirmando de esta forma que el efecto sobre proliferación descrito para el ojo también se reproduce en otros órganos, y por lo tanto, parece ser un mecanismo general.



**Fig 32: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario fuerza a las células a entrar en división.**

(A) Plano medio de un disco del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald*. En rojo se muestra la expresión de *Ald*, en verde la expresión del marcador de mitosis PH3 y en azul Dlg. Estos discos muestran un incremento en el número de células PH3 positivas, pero no todas las células que expresan *Ald* están en fase M del ciclo (flechas blancas). (B) Plano apical de un disco *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP; UASald*. La expresión del marcador de fase S (EdU) se muestra en verde, el territorio de sobre-expresión está marcado por la presencia de la proteína GFP (en rojo en esta imagen) y Dlg está teñido en azul. Las células que sobre-expresan *ald* incrementan la incorporación de EdU (flechas blancas).

Por otro lado, dado que la sobre-expresión de *ald* da lugar a un incremento en los niveles de CycB, y que estudios realizados en cultivos celulares humanos mostraban cómo una bajada de los niveles de Mps1 (ortólogo humano de *ald*) estaba asociada a un incremento de la expresión de las ciclinas A y B, decidimos estudiar si el exceso de células en división causado por la sobre-expresión de este gen se debía al incremento de estas ciclinas.



**Fig 33: La sobre-expresión conjunta de CycA y CycB no fenocopia los efectos ocasionados por la sobre-expresión de *ald*.**

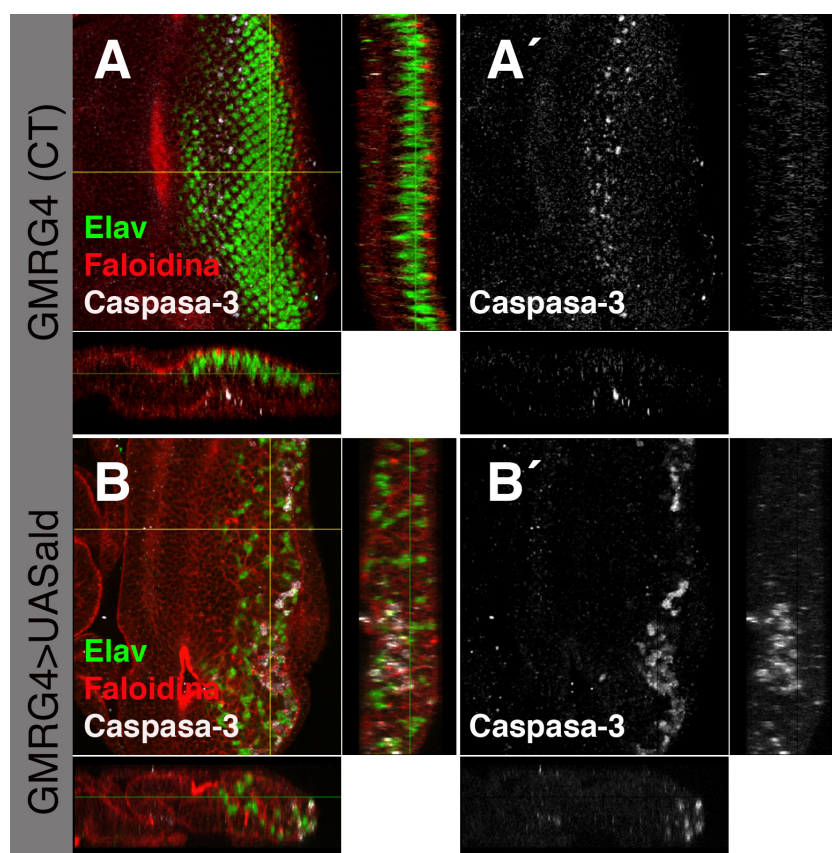
(A) Sección apical de un disco *GMRGal4* control. (B) Sección apical de un disco *GMRGal4>UASCycA; UASCycB*. La expresión del marcador neuronal Elav se muestra en verde y la expresión del marcador mitótico PH3 en rojo. El disco *GMRGal4>UASCycA; UASCycB* (B) muestra un ligero incremento del número de células PH3 positivas comparado con el disco control (A). La diferenciación no parece estar afectada.

Para ello, analizamos si la sobre-expresión conjunta de CycA y CycB reproducía los efectos de la sobre-expresión de *ald*. De esta forma, estudiamos la expresión de anti-Elav y anti-PH3 en discos *GMR-Gal4>UAS-CycA; UAS-CycB*. Así, observamos que en estos discos se produce un ligero incremento del número de células PH3 positivas, comparado con el de los discos control *GMR-Gal4*, pero en ningún caso este incremento era comparable al producido por la sobre-expresión de *ald* (Fig 33). Teniendo en cuenta este resultado y el análisis del fenotipo de sobre-expresión de otros reguladores del ciclo como E2F, CycE, CycD...etc. (datos no mostrados), resultó evidente que el

efecto de *ald* era debido a un mecanismo más complejo que la mera sobre-expresión de proteínas reguladoras de ciclo.

### 3.3.2) Papel de *ald* en la regulación de la viabilidad celular, motilidad e integridad epitelial.

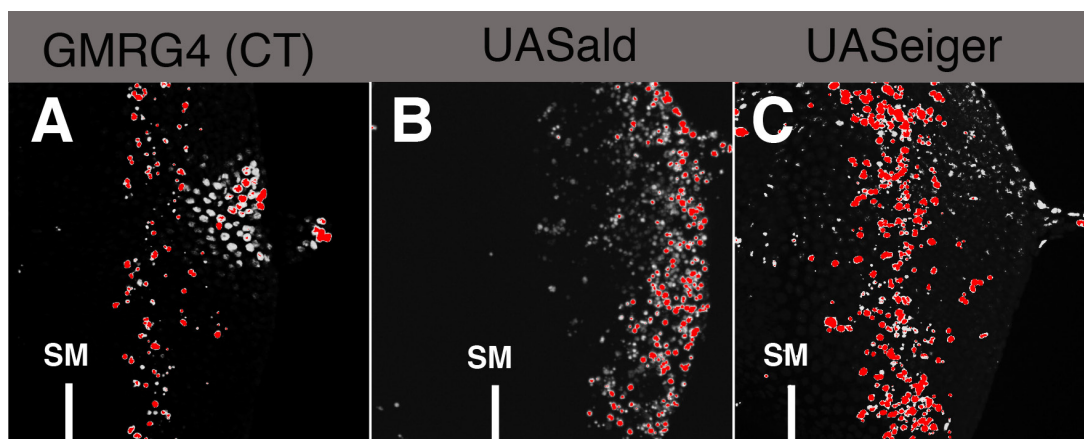
La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ojo mediante *GMR-Gal4* produce una delaminación de los fotorreceptores. Este efecto podía deberse tanto a muerte celular, como a pérdida de adhesión celular o defectos de polaridad ápico-basal. Así pues, dado que en condiciones de falta de función de *ald* habíamos observado alteración en todos estos procesos, decidimos estudiar si también se veían afectados en condiciones de ganancia de función. Para este análisis, en primer lugar realizamos tinciones inmunohistoquímicas en discos control y discos *GMR-Gal4>EP-M50.2* utilizando el marcador apoptótico Caspasa-3, el marcador neuronal Elav y el marcador del citoesqueleto de actina Faloidina.



**Fig 34: La sobre-expresión de *ald* altera el patrón normal de muerte celular en el disco imaginal de ojo-antena.**

(A,B) Plano tangencial y cortes en el eje z (transversal, (abajo); longitudinal (dcha)). (A,A', B,B) Disco *GMRGal4* control (A y A') y disco *GMRGal4>UASald* (B y B') en los que el epitelio se visualiza en rojo (Faloidina), los fotorreceptores en verde (Elav) y las células apoptóticas en Gris (Caspasa-3). Los discos control muestran una franja de células apoptóticas en torno a la región de la SDM (A'), no visualizándose células apoptóticas en la región más posterior del disco (cortes en el eje z). En cambio, en el disco *GMRGal4>UASald* la muerte celular se observa en la región más alejada del SM (B'). Cabe destacar que no existe colocalización entre Elav y Caspasa-3.

En los discos control se apreció muerte en la región de la segunda división mitótica, zona que se corresponde con las células que se han generado en exceso y que deben ser eliminadas. Sin embargo, en los discos en los que había sido sobre-expresado *ald* la muerte celular se localizó preferentemente en la región posterior del disco, en la zona más alejada del surco morfogenético (Fig. 34). Además de estas diferencias, se observó ausencia de colocalización de Caspasa-3 con los fotorreceptores (marcados por Elav), por lo que resultaba improbable que la extrusión de los fotorreceptores causada por la sobre-expresión de *ald* se debiera a un proceso apoptótico (Fig. 34). Para cercionarnos de que esto era así, comparamos el patrón de muerte celular originado por la sobre-expresión de *ald* con el de un gen inductor de apoptosis: *eiger*. Para analizar el patrón de muerte celular realizamos un marcaje con TUNEL, que detecta aquellas células que presentan ADN fragmentado. De esta forma, comprobamos que el patrón de muerte celular generado por la sobre-expresión de *ald* difiere bastante del producido por el gen inductor de muerte *eiger*. Los discos *GMR-Gal4>EP-M50.2* presentaban células muertas localizadas fundamentalmente en la región posterior del disco de ojo, mientras que en los discos en los que sobre-expresamos *eiger*, las células muertas se acumulan en torno a la región de la segunda división mitótica (Fig. 35). Por lo tanto, este resultado, junto con la falta de rescate de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de *ald* al co-expresar distintos inhibidores de muerte celular, indicaría que los defectos causados por la sobre-expresión de *ald* en el disco de ojo no se deben únicamente a un incremento de muerte celular.

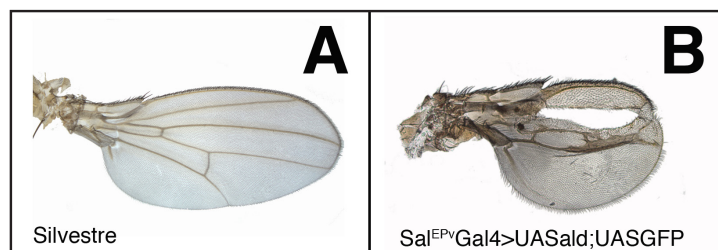


**Fig 35: La sobre-expresión del gen inductor de apoptosis *eiger* no fenocopia el patrón de muerte celular observado al sobre-expresar *ald*.**

Plano tangencial de discos de ojo-antena tercer estadio larvario de los genotipos (A) *GMRGal4*, (B) *GMRGal4>UASeiger* y (C) *GMRGal4>UASald*. La tinción se corresponde con el marcaje para TUNEL, que marca los núcleos que presentan el ADN fragmentado. El disco control muestra el patrón normal de muerte celular, en una franja delimitada tras el SM. (B) La sobre-expresión de *ald* induce muerte masiva, que se observa principalmente en la región posterior del disco de ojo-antena. (C) La sobre-expresión de *eiger*, incrementa el número de células TUNEL positivas, pero su efecto se restringe a la zona donde se aprecia muerte celular en el control.

En el caso del ala, la sobre-expresión de *ald* utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4* da lugar a alas adultas de tamaño reducido que presentan agujeros o pérdida total del territorio afectado (Fig. 36). Esta pérdida de tejido, podía ser debida a que las células que expresan *ald* a altos niveles son eliminadas por muerte celular.

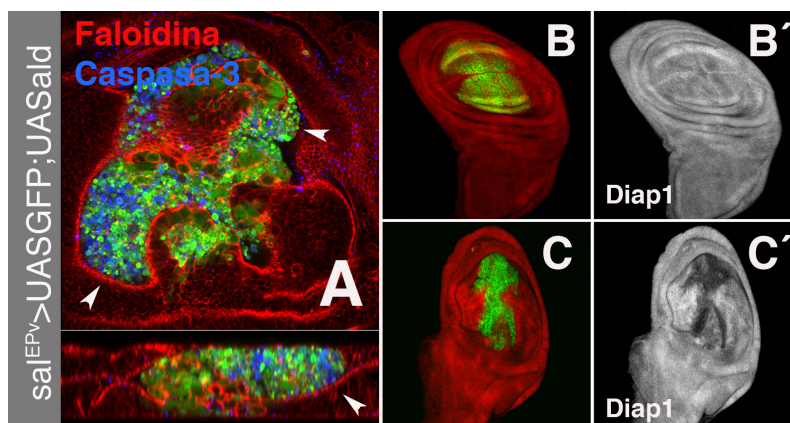




**Fig 36: La sobre-expresión de *ald* en el territorio sal del ala provoca pérdida de tejido en dicha región, afectando al patrón de venas y dando lugar a alas de tamaño reducido.**

(A) Ala adulta silvestre. (B) Ala adulta del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald*.

El análisis del epitelio del disco imaginal mostró un elevado número de células Caspasa-3 positivas en el territorio sal (Fig. 37A). A su vez, también observamos una marcada reducción de los niveles de Diap1 (inhibidor de apoptosis) en la región de sobre-expresión de *ald* (Fig. 37C'). Aunque, al igual que ocurría en el ojo, el fenotipo de sobre-expresión de *ald* en el ala, no se reduce a la mera inducción de muerte celular.

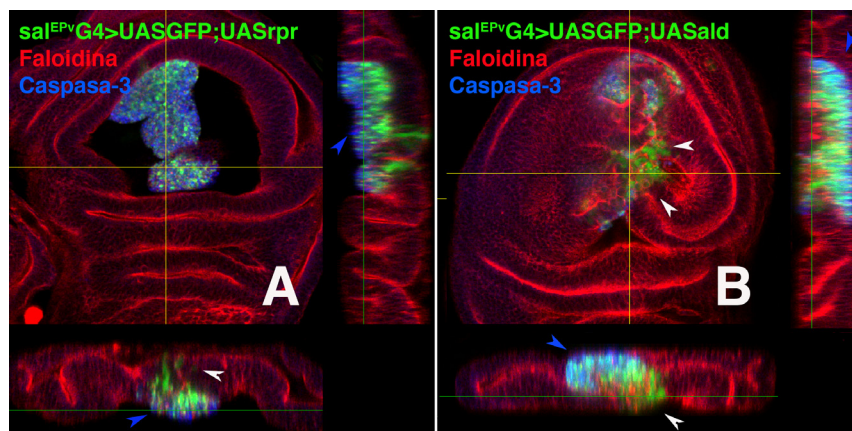


**Fig 37: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario induce muerte celular masiva y elimina la expresión de Diap1.**

(A) Plano medio de la región presuntiva de ala de un disco imaginal en el que se ha sobre-expresado *ald* utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>Gal4* (en la región inferior se puede ver un corte transversal del tejido). El epitelio está marcado en rojo (faloidina), las células que expresan *ald* son GFP positivas (verde) y en azul se muestra la expresión del marcador de apoptosis Caspasa-3. Gran parte de las células que expresan *ald*, co-expresan Caspasa-3 (flechas). (B,C) Disco *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP* control (B) y *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;UASald* (C). La expresión del inhibidor de las caspasas efectoras Diap1 se muestra en rojo (B,C) y gris (B',C'). La sobre-expresión de *ald* reduce de manera drástica los niveles de Diap1.

Este hecho se pone de manifiesto al comparar de nuevo el patrón de muerte de *ald* y de un gen inductor de apoptosis, en este caso *reaper* (Fig. 38). Así, la expresión de *reaper* con el driver *sal<sup>EPv</sup>-Gal4*, provoca que las células se delaminen del epitelio y terminen en la región basal sin afectar a la arquitectura tisular (Fig. 38A). En el caso de la activación de *ald*, las células se movilizan tanto por la región apical como por basal y mueren predominantemente en la región apical, perdiéndose además la estructura epitelial, a diferencia de lo observado con la activación de *reaper* (Fig. 38B). Además, el citoesqueleto de actina se desorganiza y se pueden distinguir células redondeadas de gran tamaño que no expresan el marcador de muerte celular Caspasa-3 (Fig. 38B). Así mismo,

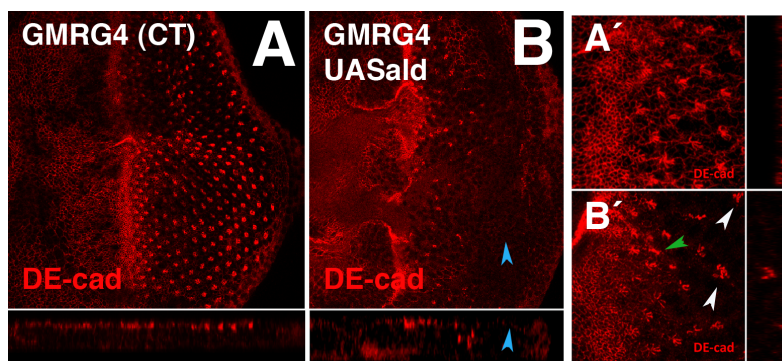
al igual que en el ojo, la co-expresión de inhibidores de muerte celular, no rescata el fenotipo de sobre-expresión de *ald* en el ala (ver apartado de Muerte celular).



**Fig 38:** El fenotipo de sobre-expresión de *ald* difiere del fenotipo de sobre-expresión del gen inductor de apoptosis *reaper*.

(A) Corte en el plano basal del epitelio de un disco en el que se ha sobre-expresado el gen *reaper* en el dominio sal. En la región inferior se muestra un corte transversal y a la derecha un corte longitudinal. (B) Corte en el plano basal del epitelio de un disco *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;UASald*. Los cortes en el eje z se disponen de la misma forma que en el control. (A,B) Las células que sobre-expresan *reaper* activan caspasa y se delaminan hacia la zona basal sin afectar al epitelio (flecha blanca y flechas azules). Las células que activan *ald*, mueren y se acumulan principalmente en la región apical (flechas azules). Parte de las células que expresan *ald* no co-localizan con Caspasa-3 y presentan una morfología redondeada y un tamaño más grande que las células del territorio silvestre (Flechas blancas).

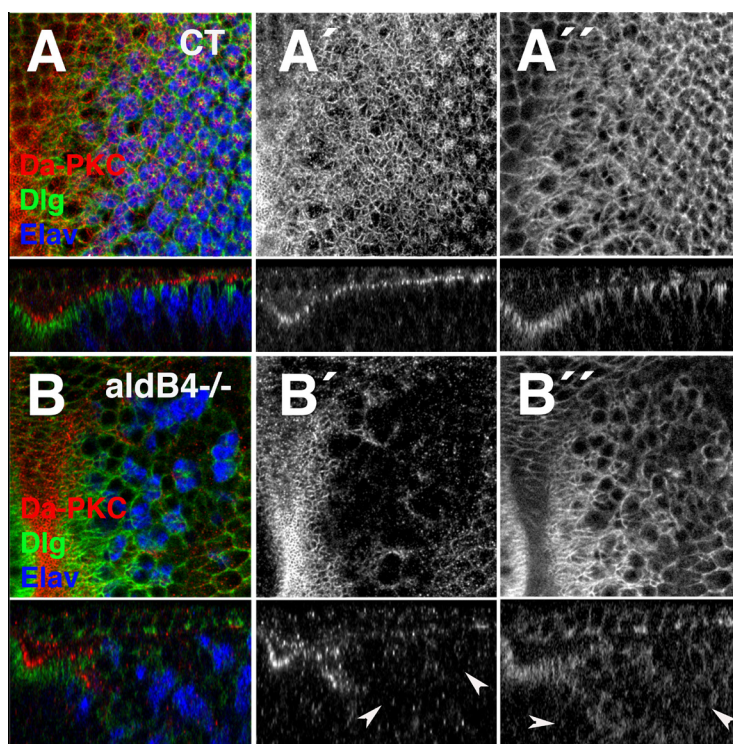
Una vez descartada la muerte celular como única responsable del fenotipo de sobre-expresión de *ald*, y teniendo en cuenta la desestructuración del citoesqueleto de actina que se observa al sobre-expresar este gen tanto en discos de ala como de ojo, analizamos el estado de la adhesión celular y la polaridad ápico-basal en discos *GMR-Gal4>UAS-ald* y *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald*.



**Fig 39:** La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ojo antena de tercer estadio larvario genera defectos de adhesión celular.

(A) Plano apical y sección longitudinal (región inferior) de un disco *GMR-Gal4* control. (B) Disco *GMR-Gal4>UAS-ald*. (A',B') Detalle a más aumento de la región del SM y la región inmediatamente posterior al mismo (cortes transversales a la derecha). El patrón de expresión de DE-cad se muestra en rojo. (A) En el disco control se observa el acúmulo característico de DE-cad en el SM y su restricción posterior al formarse los arcos, rosetas y grupos de fotorreceptores (estos acúmulos se localizan en el plano apical del epitelio (corte longitudinal)). (B) Los discos que sobre-expresan *ald*, presentan defectos en el patrón de DE-cad, tanto en el SM, como en las regiones posteriores, siendo el efecto más drástico en las regiones más alejadas del SM (flecha azul). En el corte longitudinal, se aprecia la deslocalización inicial de los fotorreceptores y la pérdida total de DE-cad que se produce en la región más posterior (flecha azul). (A',B') A más aumento, se distingue como la formación de los arcos y las rosetas es defectuosa, evidenciándose la reducción de los niveles de la proteína en regiones posteriores y los defectos de adhesión celular (flechas blancas).

En el caso del disco de ojo, los discos control presentan altos niveles de DE-cad en el SM que después se restringen a las uniones entre fotorreceptores que formaran los omatidios (Fig 39A,A'). En cambio, al sobre-expresar *ald*, observamos una marcada disminución de los niveles de DE-cad en la región apical y defectos en la distribución de la misma en los omatidios, visualizándose figuras aberrantes (Fig 39B'). En cortes transversales de discos control, se pudo distinguir como la DE-cad se distribuía a lo largo del epitelio en la región subapical, apreciándose los acúmulos correspondientes a los omatidios (Fig. 39A, A'). En el caso de los discos *GMR-Gal4>UAS-ald*, dichos acúmulos eran desiguales y se localizaban a distintos niveles, perdiéndose totalmente su expresión en regiones alejadas del surco morfogenético (Fig. 39B,B'). De la misma forma, cuando analizamos el patrón de Da-PKC y Dlg en estos discos se apreció una clara diferencia en el efecto sobre ambas proteínas. La expresión de Da-PKC desaparecía por completo de la región apical, siendo más evidente el efecto en las regiones alejadas del surco morfogenético (Fig. 40B,B'). Por otro lado, también se observó una deslocalización de Dlg, perdiéndose su expresión baso-lateral en el epitelio (Fig. 40B,B').



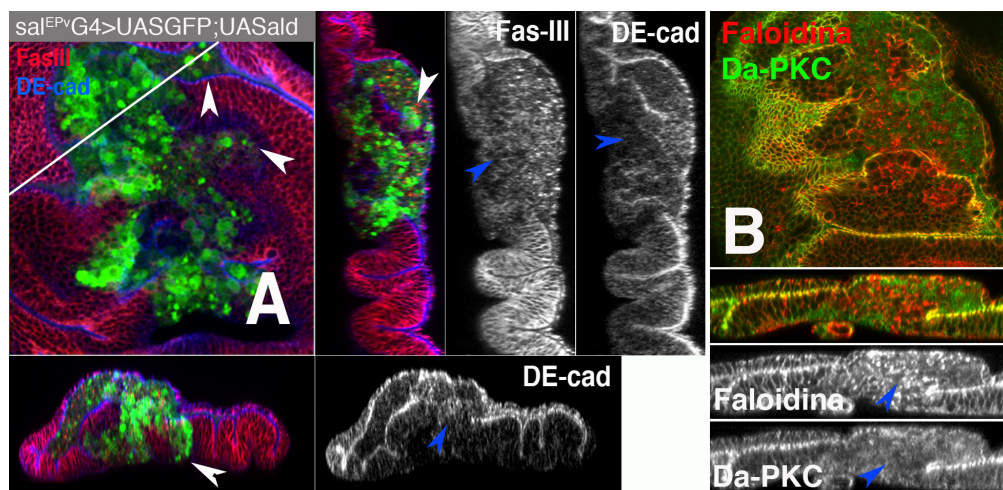
**Fig 40: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ojo-antena de tercer estadio larvario induce movilidad celular, acompañada de pérdida de polaridad apico-basal.**

Plano apical en el que se muestra el SM y la zona inmediatamente posterior de un disco *GMRGal4* control (A) y de un disco *GMRGal4>UASald* (B). En la región inferior de cada figura se localiza el corte longitudinal en el eje z. Las neuronas se muestran en azul (marcadas por la expresión de Elav) y los marcadores de polaridad Da-PKC y Dlg en rojo y verde respectivamente. El disco control presenta la localización característica de Da-PKC en la región apical (A,A') y de Dlg en el dominio baso-lateral (A,A'). En cambio, en el disco *GMRGal4>UASald* se pierde la expresión de Da-PKC por completo (flechas en B') y Dlg se deslocaliza (flechas en B'). Esta pérdida de polaridad va acompañada de movilización en el plano apico-basal de los fotorreceptores.

En el disco de ala obtuvimos resultados similares. Así, encontramos que en los discos *sal<sup>EP</sup>-Gal4>UAS-GFP;UAS-ald* las células que expresan *ald* a altos niveles (GFP positivas) también per-



dían la expresión de DE-cad y de marcadores de polaridad como Fas-III (Fig41A), Da-PKC (Fig 41B) o Dlg. Por lo tanto, la sobre-expresión de *ald*, al igual que ocurre en condiciones de falta de función, provoca una pérdida de integridad epitelial. Aunque, en el caso de la sobre-expresión, los efectos son mucho más drásticos, observándose una pérdida total de adhesión celular, polaridad apico-basal y una marcada desestructuración del citoesqueleto de actina.



**Fig 41: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario induce pérdida de adhesión celular, pérdida de polaridad apico-basal e induce movilidad celular.**

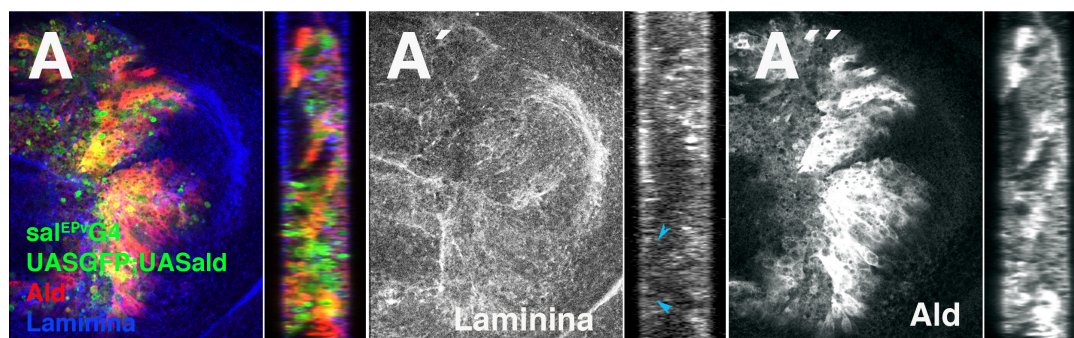
(A) Plano medio de un disco de ala del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UASGFP;UASald*. En la región inferior se muestra un corte transversal de la zona marcada por una línea blanca. En la región derecha se muestra un corte longitudinal. El epitelio se ha teñido para el marcador de polaridad Fas-III (rojo) y DE-cad (Azul). Las células que sobre-expresan Ald co-expresan GFP (verde). Se observa como las células GFP positivas invaden la región entre los pliegues del epitelio y el territorio silvestre adjacente (flechas blancas). Además, se observa una desintegración del epitelio, marcada por la pérdida de expresión de DE-cad en la región sub-apical del epitelio y por la pérdida del marcador de polaridad Fas-III. (B) Sección tangencial de la región presuntiva de ala de un disco imaginal del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UASald* (En la región inferior se muestra el corte transversal del tejido). El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (Faloidina) y Da-PKC se marca en verde. En este disco se observa desorganización del citoesqueleto de actina, especialmente clara en el corte transversal (flecha azul). A su vez, se pierde totalmente la expresión de Da-PKC (flecha azul).

Estos resultados, en su conjunto, indican que la sobre-expresión de *ald* produce efectos similares en las distintas estructuras epiteliales de *Drosophila*.

### 3.3.3) La sobre-expresión de *ald* induce una transición-epitelio mesénquima.

Tal y como hemos descrito con anterioridad, las células que sobre-expresan *ald* pierden totalmente las características epiteliales, continúan dividiéndose, y se movilizan por el epitelio (Fig41). Por lo tanto, estos datos parecen indicar que la sobre-expresión de *ald* induce una transición epitelio mesénquima (TEM). Normalmente, las células que sufren esta transformación se vuelven invasivas y degradan la lámina basal (Igaki, Pagliarini et al. 2006; Wu, Egger et al. 2008). Así pues, quisimos analizar si la lámina basal se veía alterada en los discos *sal<sup>EPV</sup>-Gal4>UAS-GFP;UAS-ald*. La lámina basal está formada por diversos componentes, entre los que destaca la Laminina, proteína que, a su vez, esta formada por varias subunidades (a,b,c). En nuestro caso, tratamos de establecer si existían defectos en la localización de la Laminina, marcando los discos frente a la subunidad beta de la misma, también denominada Laminina B (LamB). En zonas silvestres del disco se observó un den-

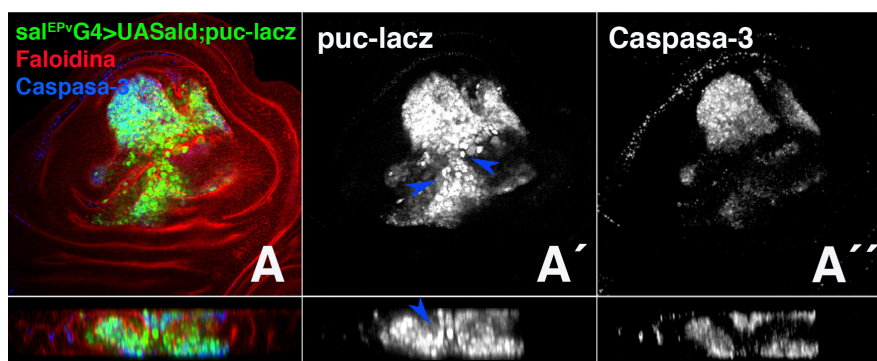
so entramado de LamB, mientras que en la región correspondiente a las células que expresan *ald* a altos niveles, dicha expresión se altera. Se apreciaron acúmulos de la proteína desorganizados y una reducción en los niveles de LamB que se correspondían con la presencia de células GFP positivas (Fig. 42). Además, en un corte transversal del tejido, la bajada de los niveles de LamB se correlaciona de forma clara con la presencia de células con altos niveles de *Ald*. Por lo tanto, este resultado apoya la idea de que las células que sobre-expresan *ald* sufren una transición epitelio mesénquima.



**Fig 42: Las células que sobre-expresan *ald* degradan la lámina basal.**

(A) plano basal de la región presuntiva de ala de un disco imaginal del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;UASald*. A la derecha se observa un corte longitudinal del tejido. Las células que sobre-expresan *ald* están doblemente marcadas, por GFP verde y por la presencia de Ald (rojo). La lámina basal se muestra en azul (Laminina). En la región donde se localizan las células que sobre-expresan Ald se pierde la expresión de Laminina (flechas azules).

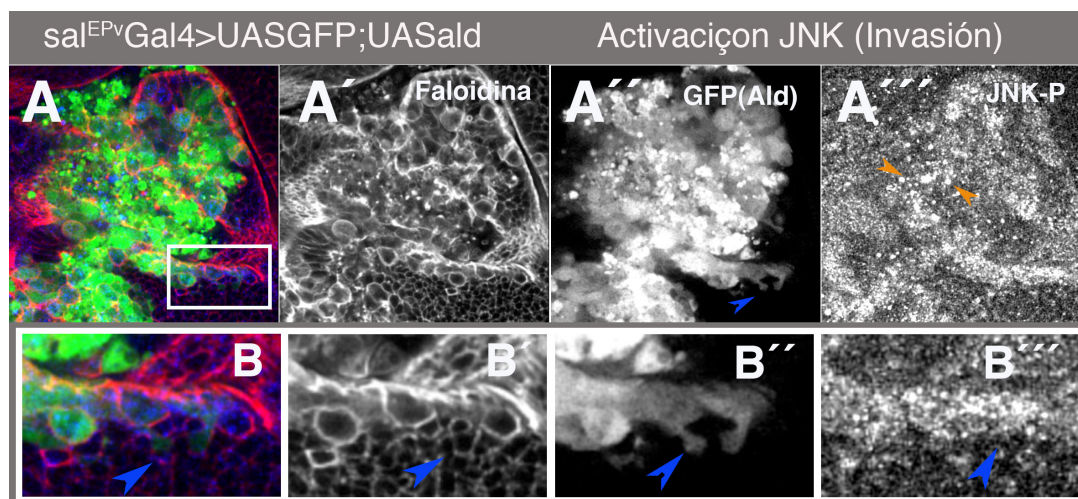
A su vez, teniendo en cuenta que varios estudios habían demostrado el requerimiento de la activación de la vía de las Jun kinasas (JNK) para mediar estos efectos (Pastor-Pareja, Grawe et al. 2004; Santibanez 2006) (Shintani, Wheelock et al. 2006) quisimos comprobar si esta vía estaba activa en los discos *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UAS-ald*. En primer lugar, se testó la expresión de *puc-lacZ*, que se utiliza como sensor de la activación de la vía de las JNK (Martin-Blanco et al., 1998). En este caso, pudimos observar la activación de la expresión de *puc* en el territorio en el que se estaba sobre-expresando *ald* (Fig. 43).



**Fig 43: La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario activa la vía de las JNK.**

(A) Plano central y corte transversal (localización basal) de un disco imaginal de ala del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;puc-lacZ*. El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (faloidina). (A,A') La expresión del lac-z se visualiza en verde (A) y gris (A') (B-galactosidasa). La expresión de Caspasa-3 se muestra en azul (A) y gris (A'). En el territorio sal se observa expresión de *puc* en distintos tipos de células. Por un lado, células que han activado la vía apoptótica (A,A'). Por otro lado, células redondeadas de mayor tamaño, que no han activado el programa apoptótico (A,A').

Debido a que esta vía, en función de sus niveles de activación, también induce muerte celular, realizamos un doble marcaje para *puc* y Caspasa-3, con objeto de distinguir las distintas funciones de la misma (Fig. 43). Así, pudimos diferenciar dos tipos celulares: por un lado, células que co-expresan *puc* y Caspasa-3 (indicando que han activado la vía apoptótica), y por otro, células que sólo expresan *puc* (Fig. 43). La expresión de *puc* indica que la vía de las JNK está activa, pero a su vez es un regulador negativo de la misma, por lo que decidimos testar si la forma fosforilada de la Jun Kinasa (JNK-P), que se corresponde con su forma activada, reproducía el patrón de expresión que habíamos observado para *puc-lacZ*. En este caso, se detectaron niveles de JNK-P elevados en el territorio *Sal*, aunque no de forma homogénea como ocurriría con *puc-lacZ* (Fig. 44A,A'). Las células que estaban muriendo presentaban acúmulos de JNK-P localizados, mientras que las células de mayor tamaño (células redondas) descritas con anterioridad, mostraban niveles más homogéneos (Fig. 44 A,A'',B,B''). Los niveles de JNK-P presentes en las células grandes y redondeadas que estaban en contacto con el territorio silvestre eran más elevados, y en ocasiones, se apreciaron en estas células protusiones citoplasmáticas que se asemejan a filopodios (Fig. 44 A,A'',A''', B-B''). Por lo tanto, la sobre-expresión de *ald* parece activar distintas funciones de la vía de las JNK, como son la inducción de muerte celular y adquisición de capacidad invasiva.

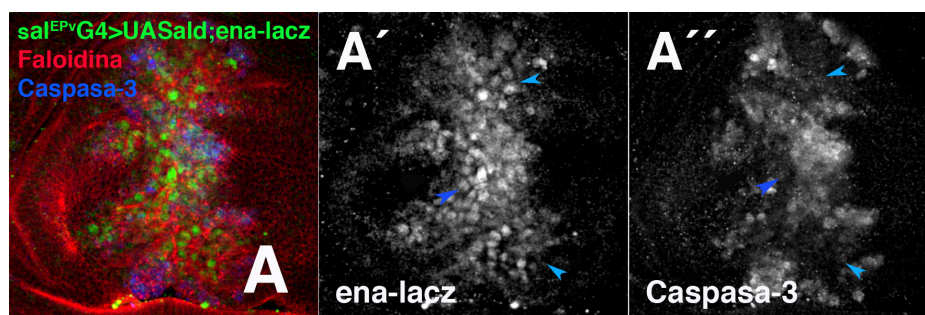


**Fig 44: Las células que sobre-expresan *ald* presentan elevados niveles de P-JNK y adquieren movilidad**  
(A) Plano apical de un disco imaginal del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;UASald*. (B) Ampliación de dos células invasivas. El epitelio está marcado en rojo (faloidina) (A,B) y en gris (A',B). Las células que sobre-expresan Ald co-expresan GFP (verde A,B y gris A'',B'). La activación de la vía de las JNK se mide por la expresión de P-JNK (azul A,B y gris A''',B''). Las células grandes y redondeadas que se forman al sobre-expresar *ald* presentan elevados niveles de P-JNK (A, A''',B''). Parte de estas células emiten lamelipodios e invaden el tejido adyacente (A,A'', B,B',B'' (flechas azules)). También existen acúmulos localizados de P-JNK en células de apariencia picnótica (células apoptóticas) (flechas naranjas en A'').

Por otro lado, estudios en vertebrados han establecido que el incremento de Mena, miembro de la familia de fosfoproteínas VASP, regula la motilidad celular, aumentando sus niveles en células tumorales invasivas. En *Drosophila*, Enabled (Ena) es el homólogo de Mena y es conocido por su función reguladora del citoesqueleto de actina. Así pues, dado que ensayos de doble híbrido han establecido que *ald* y *ena* interaccionan de forma directa (*Flybase*) y teniendo en cuenta la transformación celular que habíamos observado en los discos que sobre-expresaban *ald*, quisimos ver si los niveles de *ena* se incrementaban en estas condiciones. Para ello, analizamos el patrón de expresión



de *ena* y del marcador de muerte celular Caspasa-3 en discos *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald/ena-lacZ*. Estos discos, mostraron expresión de *ena-lacZ* en respuesta a la activación de *ald*, apreciándose niveles bajos en las células Caspasa-3 positivas y niveles más elevados en las células redondeadas (Fig.45). Este hecho puede ser debido a que, en primera instancia, las células que sobre-expresan *ald* activan la expresión de *ena*, sin embargo una vez activado el proceso apoptótico se degrada la expresión del Lac-Z. Por lo tanto, estos datos sugieren que la sobre-expresión de *ald* genera una TEM, debida en parte posiblemente a la activación de la vía de las JNK y/o al incremento de los niveles de *ena*.

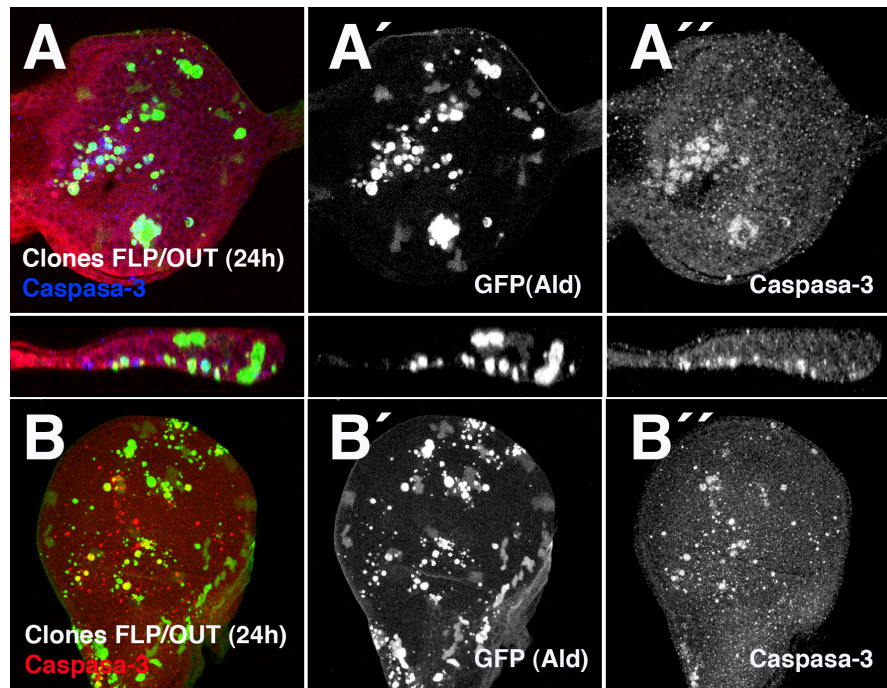


**Fig 45: La sobre-expresión de *ald* induce la expresión a nivel transcripcional de *enabled*.**

(A) Plano tangencial central de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;ena-lacZ*. El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (A). La expresión del lac-z se muestra en verde (A) y gris (A'). La activación de la Caspasa-3 está marcada en azul (A) y gris (A''). Se observa expresión de *ena* en las células del territorio *sal*, donde se sobre-expresa *ald* (A,A'). Las células grandes y redondeadas que no expresan Caspasa-3 (flechas azules en A') muestran niveles más elevados de lac-z (flechas azules en A'). Parte de las células que han entrado en apoptosis también presenta bajos niveles de *ena-lacZ*.

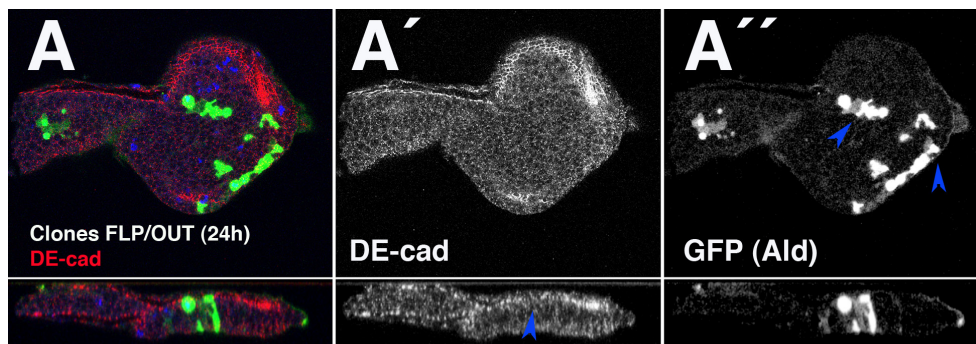
### 3.3.4) Análisis clonal.

Debido a que, en ocasiones, el efecto de la expresión de una proteína en parches discretos difiere del observado cuando se expresa en un territorio más amplio, decidimos inducir clones de sobre-expresión de *ald* mediante el sistema Flp-out (Xu and Rubin 1993). Los clones se indujeron a las 36 y 60h tras la puesta del huevo y se analizaron a las 144h, pero no se detectó presencia de los mismos (ausencia de GFP). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la sobre-expresión de *ald* utilizando diferentes líneas Gal4 daba lugar a pérdida de integridad epitelial e inducía muerte celular, nos pareció factible que estuvieran siendo eliminados del epitelio. Para determinar si esto es lo que estaba ocurriendo, indujimos clones a las 60h tras la puesta del huevo y los analizamos 24h y 48h tras la inducción. Al analizar los discos 24h después de la inducción, se observaron clones, en su mayoría unicelulares, dispersos por el epitelio (Fig. 46). 48h después de la inducción, observamos que dichos clones desaparecían prácticamente en su totalidad.. Estos clones colocalizaban en un alto porcentaje con el marcador de muerte celular Caspasa-3, indicando que estaban siendo eliminados por apoptosis. Además, a pesar de su reducido tamaño, eran capaces de eliminar marcadores de adhesión celular, como ocurre con DE-cad (Fig. 47). Parte de las células GFP positivas eran grandes y redondeadas aunque, en ocasiones, las células presentaban una morfología alterada, apreciándose protusiones citoplasmáticas laterales (Fig. 47). En su conjunto, estos datos indican que, a pesar de que el efecto de la sobre-expresión de *ald* produce defectos similares al inducirse en parches o en territorios más extensos, los clones, al estar aislados, son eliminados del epitelio sin afectar a la integridad del mismo. De hecho, este efecto se pone de manifiesto por la falta de defectos observada en discos disectados más tarde de las 48h tras la inducción o al analizar los individuos adultos.



**Fig 46: Los clones de sobre-expresión de *ald* son eliminados por muerte celular.**

(A) Plano basal de un disco imaginal de ojo-antena en el que se han inducido clones (mediante la técnica FLP/OUT) a las 72h tras la puesta del huevo y se han disectado 24h después (corte longitudinal del epitelio en el panel inferior). (B) Plano basal de un disco imaginal de ala que ha sufrido el mismo tratamiento. Los clones están marcados por la expresión de GFP (verde en A,B y gris en A',B). La morfología de los clones es redondeada, normalmente son unicelulares y activan al vía apoptótica (A,A'', B,B''). Se aprecia muerte autónoma y muerte no autónoma en el epitelio.



**Fig 47: Los clones de sobre-expresión de *ald* inducen pérdida de adhesión celular.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ojo-antena en el que se han inducido clones (FLP/OUT) a las 72h tras la puesta del huevo y se han disectado 24h después (corte longitudinal en los paneles de abajo). El marcador de adhesión celular DE-cad se muestra en rojo (A) y gris (A'). Los clones están marcados positivamente (GFP, verde A y gris A'). En el corte longitudinal se puede ver como en la región donde hay un clon, se pierde la expresión de DE-cad (flecha azul en A'). La morfología de las células que sobre-expresan Ald recuerda a células migratorias (flechas azules en A,A').

Considerando todos los resultados expuestos, utilizando tanto condiciones de falta como de ganancia de función de *ald*, podemos concluir que este gen es necesario para mantener la integridad epitelial y la viabilidad celular de manera generalizada en distintas estructuras epiteliales. Por otro lado, también hemos observado que la perturbación de los niveles de *Ald* produce un



incremento de la proliferación celular. Aunque se ha descrito que una pérdida de integridad epitelial puede dar lugar a un incremento de la proliferación, no podemos descartar que el efecto de *ald* sobre el control de la división celular pueda ser indirecto. Por esta razón, decidimos centrarnos en la caracterización de la función de *ald* como regulador del mantenimiento de la integridad del epitelio.

#### 4.- FUNCIÓN DE ALD EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD EPITELIAL.

##### 4.1.- Interacciones genéticas entre *ald* y distintos genes requeridos para el establecimiento y/o mantenimiento de la integridad epitelial.

Para establecer el posible mecanismo de acción de esta quinasa llevamos a cabo interacciones genéticas combinando moscas de genotipo *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>* con distintos interactores escogidos en base a su papel en la regulación de los distintos procesos que se ven afectados al modificar los niveles de Ald. Los resultados se muestran en la Fig 48.

TABLA INTERACCIONES <i>en-Gal4&gt;UAS-ald<sup>ARNi</sup></i> / <i>UAS-X</i>		
25°C	<i>en-Gal4&gt;UAS-ald<sup>ARNi</sup></i>	<i>en-Gal4&gt;UAS-GFP</i>
<i>sqh</i> ARNi	Letal P (LP)	LP
<i>sqh<sup>EE</sup></i>	No rescata (NR)	Silvestre
<i>sqh<sup>AA</sup></i>	NR	Silvestre
<i>diaphanus</i> ARNi	Rescate parcial	Polaridad y - tamaño
<i>Cdc42<sup>N17 (DN)</sup></i>	LP	Polaridad
<i>Cdc42<sup>V12</sup></i>	Letal Embrionario (LE)	LP
<i>Rho1</i> ARNi	LE	LE
<i>Rho1<sup>V14 (CAT)</sup></i>	Letal (L)	L
<i>Rho1<sup>N19 (DN)</sup></i>	LE	LE
<i>rok<sup>CAT</sup></i>	Suprime	Silvestre
<i>moe</i> ARNi	Muy <b>POTENCIADO</b>	Similar a <i>en-Gal4&gt;UASald<sup>ARNi</sup></i>
<i>Moe<sup>CAT Myc</sup></i>	LP	LP
<i>Mbs<sup>N300</sup></i>	Potencia F de polaridad	Silvestre
<i>Pp2A</i> ARNi	LE	LE
<i>Pp2AA</i>	Potenciado	Silvestre
<i>PpC1</i> ARNi	Rescate sutil	Silvestre
<i>Pp113C</i>	NR	Silvestre
<i>shotgun</i>	Rescata	Silvestre
<i>Crb<sup>intra</sup></i>	Potencia	Silvestre
<i>aPKC<sup>CAT</sup></i> Fuerte	LE	LP
<i>aPKC<sup>CAT</sup></i> Intermedio	LP (pocas pupas)	LP
<i>aPKC<sup>CAT</sup></i> Suave	Rescate sutil	Defectos de polaridad
<i>aPKC<sup>DN</sup></i> Fuerte	Células más grandes	Silvestre
<i>aPKC<sup>DN</sup></i> Suave	Rescate notable	Silvestre
<i>lgl</i> ARNi	<b>POTENCIACION</b>	Incremento tamaño sutil
<i>dlg</i> ARNi	<b>POTENCIACION</b>	Polaridad
<i>Rab11</i> ARNi	LE	LE
<i>sec15</i> ARNi	LE	LP
<i>Dronc</i> ARNi	Suprime muescas	Falta de adhesión
<i>Diap1</i>	Más grandes	Silvestre
<i>puc</i>	<b>POTENCIACION</b>	Silvestre

48. Tabla resumen de las interacciones genéticas llevadas a cabo en condiciones de falta de función de *ald* (*en-Gal4>UASald<sup>ARNi</sup>*).

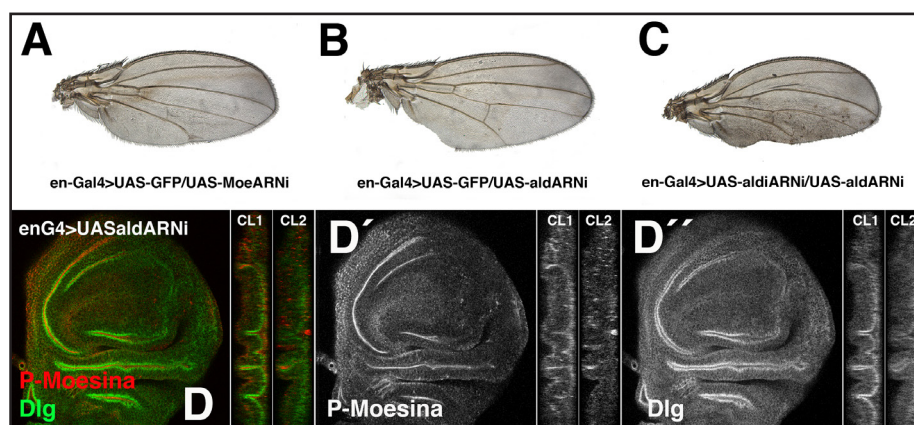
La primera columna muestra los UAS correspondientes a las proteínas co-expresadas en combinación con el ARNi de *ald* en el compartimento posterior del ala. En azul se muestran las combinaciones que modifican el fenotipo de falta de función de *ald* y en negro las que no varían. La interacción más significativa está destacada en verde.

#### 4.2.- Papel de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial en el disco imaginal de ala: Moe-Rho1.

Tanto la sobre-expresión de *ald* como su falta de función generan defectos de adhesión celular, pérdida de polaridad apico-basal y alteran la organización del citoesqueleto de actina en los diferentes discos imaginales analizados. Por lo tanto, para mediar estos efectos, Ald podría actuar sobre proteínas cuya función esté involucrada en la regulación de esos procesos celulares.

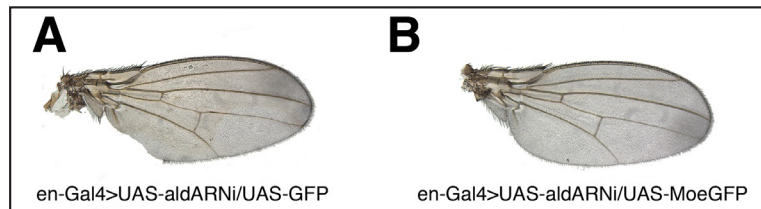
Las proteínas de la familia ERM (Erzin, Radixin y Moesin) promueven la unión de proteínas transmembrana al citoesqueleto de actina cortical y están implicadas en el control de la polaridad epitelial, la organización del citoesqueleto, adhesión celular y movilidad (Baum y Perrimon, 2001; Bretscher y cols. 2002; Shaw y col. 1998)). Moesin (Moe) es el único representante en *Drosophila* de esta familia. Han sido descritas funciones de Moe en morfogénesis, forma celular, supervivencia celular, polaridad y mantenimiento de la integridad epitelial durante el desarrollo del disco imaginal (Polesello, Delon et al. 2002; Speck, Hughes et al. 2003; Molnar and de Celis 2006). Así, la falta de función de *moe* provoca una pérdida de características epiteliales y las células adoptan un comportamiento migratorio invasivo (Speck, Hughes et al. 2003). En estos mutantes se produce una desorganización de los filamentos de actina, de manera que se acumulan en sitios ectópicos dentro de las células y desaparece de la región apical. A diferencia del tejido silvestre, el tejido mutante *moe* presenta pérdida del marcador de adhesión celular DE-cad y de marcadores de polaridad apico-basal, siendo las células extruidas por la región basal del epitelio (Speck, Hughes et al. 2003). Se ha propuesto que Moe funciona manteniendo la integridad epitelial antagonizando la actividad de Rho1 (Speck, Hughes et al. 2003). Rho1 es una pequeña GTPasa perteneciente a la subfamilia Rho que incluye también a las pequeñas GTPasas Rac y Cdc42. Estas proteínas actúan como reguladores de la organización de actina, adhesión celular, citocinesis, progresión del ciclo celular y migración. En el disco imaginal de ala, la falta de función de Rho1 rescata sustancialmente el fenotipo mutante *moe*, estableciendo así una relación genética de antagonismo funcional (Speck, Hughes et al. 2003). De esta forma, en base a estos datos y los resultados expuestos en el apartado anterior, tanto Moe como Rho1, podrían ser buenos candidatos a estar siendo regulados por Ald.

Los fenotipos de falta de función de Moe y de Ald son similares (Fig 49 A,B) y además, observamos un efecto sinérgico en condiciones de falta de función (Fig 49C). Esto nos indica que podría existir una posible relación funcional entre ambas proteínas. Así, analizamos si los niveles de Moe fosforilada (P-Moe), que es la forma activa de la proteína, se modificaban al disminuir la actividad de Ald. De esta forma, observamos que en discos *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>* (25°C) se producía una reducción de los niveles de fosforilación de Moe en el compartimento posterior del disco, siendo este efecto más notable en discos tardíos de tercer estadio larvario (Fig 49D, D'). Todos estos resultados sugieren que Moe podría estar mediando la función de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial. Considerando esta hipótesis, cabía esperar que la expresión de una forma constitutivamente activa de Moesina (Moe<sup>T559D</sup>) pudiera rescatar al menos parte del fenotipo producido por la falta de función de *ald*. Sin embargo, la sobre-expresión de esta forma de Moe, bajo el control de *en-Gal4*, resultó ser letal. Así, de forma alternativa analizamos si la sobre-expresión de la proteína silvestre Moe era suficiente para suprimir el fenotipo de las alas *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>*. En este caso, la co-expresión del ARNi de *ald* y UAS-moe-GFP dió lugar a un rescate significativo (Fig 50). Por lo tanto, estos resultados indicarían que el fenotipo de falta de función de *ald*, es debido, al menos en parte, a la reducción de la función de Moe.



**49. Efecto sinérgico de la falta de función de *ald* y Moesina. Ald regula los niveles de fosforilación de Moesina**

(A) Ala adulta del genotipo *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-MoeARNi*. (B) Ala adulta del genotipo *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-MoeARNi*. (C) Ala adulta del genotipo *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/UAS-MoeARNi*. La reducción de los niveles de Moe (A) da lugar a un fenotipo sutil de integridad del epitelio similar al observado en condiciones de falta de función de *ald* (B). La combinación de la falta de función de ambas proteínas potencia este fenotipo (C). (D) Plano apical de un disco imaginal de ala del genotipo *enG4>UASald<sup>ARNi</sup>/enG4>UASald<sup>ARNi</sup>* (25°C). (CL1) Corte longitudinal del compartimento anterior. (CL2) Corte longitudinal del compartimento posterior. (D) P-Moesina se muestra en rojo (gris en D') y Dlg en verde (gris en D''). Los niveles de P-Moesina se reducen de manera drástica en el compartimento posterior (D'). En los cortes longitudinales se puede ver como en el epitelio del compartimento anterior (CL1) P-Moe se localiza en la región apical, mientras que en el compartimento posterior (CL2) se pierde totalmente la expresión. Los niveles de Dlg también se ven reducidos, aunque en menor grado (D'').

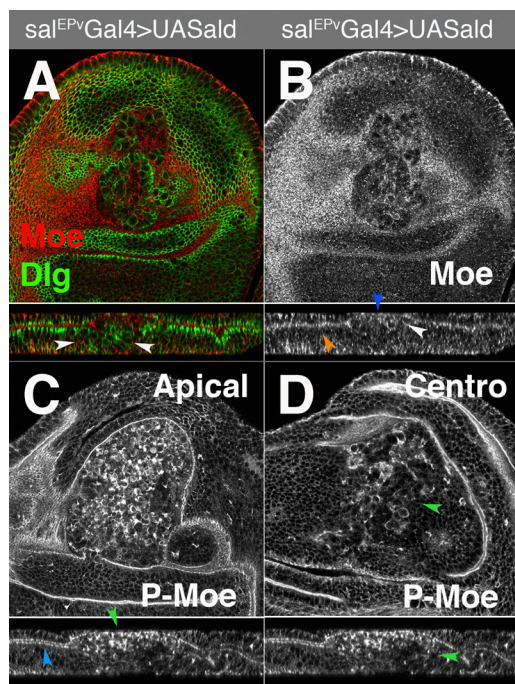


**Fig 50: La sobre-expresión de Moe-GFP rescata parcialmente el fenotipo de falta de función de *ald* en el ala.**

(A) Ala adulta del genotipo *en-Gal4>UASald<sup>ARNi</sup>/UASGFP*. (B) *en-Gal4>UASald<sup>ARNi</sup>/UAS-MoeGFP*.

Además, analizamos el patrón de expresión de Moe y P-Moe en condiciones de sobre-expresión de *ald*. En discos *sal<sup>EPp</sup>-Gal4>UAS-ald*, en el territorio silvestre Moe se expresa de manera homogénea en la región apical del epitelio (Fig 51A,B). Sin embargo, en el territorio de expresión de *sal<sup>EPp</sup>-Gal4*, observamos que mientras unas células (grandes y redondeadas) pierden por completo la expresión de Moe, aparecen otras células que acumulan altos niveles de Moe. Estas últimas células se localizan en la región donde se concentra tanto la muerte celular como la mayor parte de las células en división (Fig51A,B). De manera similar, observamos que la distribución de Moe-P característica del epitelio silvestre, se pierde en la región *sal<sup>EPp</sup>-Gal4* de estos discos (Fig51C,D). Así, encontramos las células grandes y redondeadas, que acabamos de describir, también pierden la expresión de P-Moe, mientras que en la región más apical (en la región en la que se localizaban las células que acumulan Moe) aparecen células en las que la forma fosforilada de Moe se distribuye de

forma aberrante por la membrana (Fig 51C,D). Por lo tanto, la sobre-expresión de *ald*, provoca una desintegración del epitelio observando dos efectos: por un lado, se generan células que acumulan Moe y P-Moe, y por otro lado, células que pierden la expresión de ambas proteínas. Las células que acumulan ambas proteínas parecen ser células que han activado el programa apoptótico y/o se dividen activamente, mientras que las que pierden su expresión, coinciden con las células que presentan mayores niveles de Ald y que han sufrido una TEM.

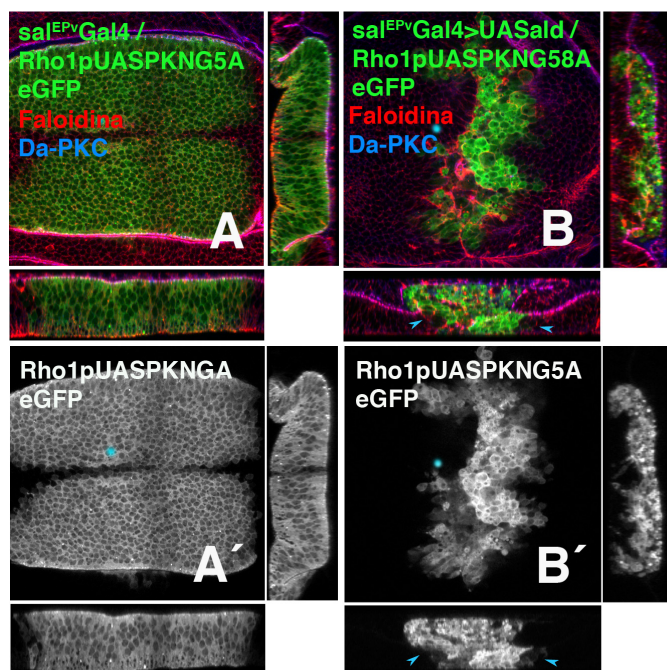


**Fig 51: El patrón de expresión de Moesina y P-Moe se altera en condiciones de sobre-expresión de *ald*.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UASald*. En la región inferior de la imagen se muestra un corte transversal. (A) Moesina se ha marcado en rojo (gris en B) y Dlg en verde. En el plano del epitelio se observa acumulo de Moesina en torno a las células grandes y redondeadas del territorio sal (sobre-expresan Ald) (A,B). En el corte transversal se distingue pérdida de la localización apical de Moesina característica del epitelio silvestre (flecha naranja en B) en las células del territorio sal (flecha azul en B). En esta zona Moesina se acumula apicalmente (flecha roja en B), perdiéndose su expresión en las células redondeadas marcadas por la presencia de Dlg en su membrana (flechas blancas en A). (C) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UASald*. (D) Plano de la región central del mismo disco. P-Moe esta marcada en gris en ambos casos. En el plano apical se aprecia un incremento de los niveles de P-Moe (C). Cuando se observa el corte transversal se puede ver que en el dominio de sobre-expresión se pierde la expresión localizada en la región apical del epitelio que se observa en el territorio silvestre (Flecha azul), formándose acúmulos de P-Moe en el dominio sal (flecha verde). En el plano central, en cambio, se reducen los niveles de P-Moe (flechas verdes en D). (hay que destacar que la función de Moesina depende de su correcta localización).

Como hemos explicado con anterioridad, Moe antagoniza la actividad de Rho en el disco imaginal de ala (Speck, Hughes et al. 2003). Por lo tanto, una inactivación de Moesina da lugar a una activación de Rho1 y viceversa. Para estudiar si la actividad de Rho1 se modificaba al sobre-expresar Ald, utilizamos un reportero para esta proteína (*pUASPKNG58AeGFP*) (Simoes, Denholm et al. 2006). Este reportero consiste en una proteína híbrida que presenta niveles basales de GFP cuando Rho1 se encuentra inactivo, pero que incrementan su intensidad cuando Rho1 se activa. Además, puede ser expresado utilizando el sistema Gal4-UAS. De esta forma, comparamos el patrón de activación en discos control (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4>Rho1pUAS-PKNG58AeGFP*) con el de los discos en los que se sobre-expresó *ald* (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4>Rho1pUAS-PKNG58AeGFP;UAS-ald*). Así, encontramos que mientras en los discos control la activación de Rho1 se restringió exclusivamente a la región apical del epitelio (Fig 52 A, A'), en los discos en los que se sobre-expresó *ald*, todas las células del territorio sal mostraron activación de Rho1 en el contorno celular (Fig 52B, B'). Este incremento también lo observamos en la región del epitelio donde se localizan principalmente células que están muriendo, y que acumulaban tanto Moe como Moe-P (Fig 52A-B'). Por lo tanto, estos resultados indican que en condiciones de sobre-expresión de *ald*, Rho1 se activa de manera ectópica, sugiriendo que a pesar de que algunas células acumulen altos niveles de Moe, esta no debe ser funcional.





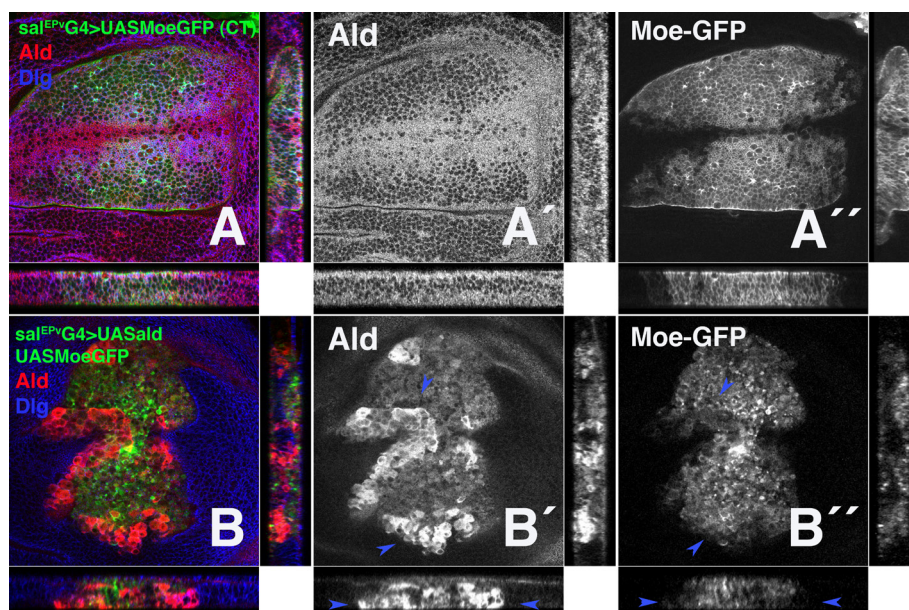
**Fig 52:** La sobre-expresión de *ald* en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario activa a Rho1.

(A) Plano medio de un disco de ala del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>Rho1pUASPKNG58AeGFP* (control). (B) Mismo plano de un disco de ala del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald; Rho1pUASPKNG58AeGFP*. En la región inferior se muestra un corte transversal del epitelio y a la derecha un corte longitudinal (apical se localiza hacia la derecha). El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (faloidina), el marcador de polaridad Da-PKC en azul. La expresión del reportero de actividad de Rho se corresponde con el patrón de GFP (verde en A,B y gris en A',B'). El reportero presenta niveles basales de GFP en el dominio donde se expresa, incrementándose la intensidad de GFP en las zonas donde Rho1 está activo. (A,A') En el disco control la activación del reportero se restringe a la región apical del epitelio. (B,B') En el disco en el que se sobre-exprime *ald* las células grandes redondeadas que se forman presentan Rho1 activo en la membrana (flechas azules).

Para entender si los fenotipos de sobre-expresión de *ald* están mediados por la activación ectópica de Rho1, y puesto que Moe antagoniza la actividad de Rho1, analizamos si la sobre-expresión de una forma silvestre de la proteína (Moe-GFP) podía rescatar alguno de los defectos observados en discos que sobre-expresaban *ald* (*sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald*, Fig. 53A-A'). Así, encontramos que los discos que co-expresaban *Ald* y Moe-GFP (*sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald; UAS-Moe-GFP*, Fig. 53B-B'), presentaban un fenotipo idéntico al de discos control (*sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald; UAS-GFP*, Fig.). Cuando analizamos la distribución de Moe-GFP en los discos que sobre-expresaban *ald*, observamos que Moe-GFP no estaba presente en la membrana (Fig 53B, B'), a diferencia de lo que ocurre en los discos control (*sal<sup>EPv</sup>-Gal4> UAS-Moe-GFP*, Fig 53A, A') en los que Moe siempre aparece localizada en la membrana apical de las células. Por lo tanto, la sobre-expresión de Moe-GFP no es capaz de rescatar el efecto producido por la sobre-expresión de *ald*, probablemente porque elevados niveles de Ald impiden que la proteína Moe se localice correctamente en la membrana.

Estudios previos habían demostrado que la reducción de una dosis de Rho1 es capaz de revertir completamente los defectos originados por la falta de función de Moe (Speck, Hughes et al. 2003). De esta manera, si todos los efectos causados por la sobre-expresión de *ald* se deben a una insuficiencia de Moe, la reducción de una dosis de Rho1 debería suprimir estos efectos. Para estudiar esta posibilidad analizamos las alas de individuos *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald* heterocigóticos para un alelo mutante *Rho1* y comprobamos que el fenotipo resultante era indistinguible al de las alas *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald*. Así, a diferencia de lo que ocurre en condiciones de falta de función de Moe, los defectos causados por una sobre-expresión de *ald* no se suprimen por la reducción de una dosis de Rho1, lo que indica que Ald, además de sobre Moe, debe actuar sobre otros factores. Según estos resultados, y teniendo en cuenta que Rho1 está activo en las células que sobre-expresan *Ald*, no podemos descartar que Ald pudiera activar a Rho1 de manera independiente de Moe. En ese caso, la reducción de una dosis de Rho1 no sería suficiente para suprimir los efectos causados al sobre-expresar *ald*. Por esta razón, analizamos si estos efectos se suprimían al eliminar la función de Rho1

mediante la expresión un ARNi específico. En este caso, tampoco obtuvimos un rescate del fenotipo de sobre-expresión de *ald*. Sin embargo, la expresión del ARNi de Rho1 también da lugar a un fenotipo de pérdida de integridad epitelial drástico, por lo que, este resultado no fué conclusivo.



**Fig 53: La sobre-expresión de *ald* impide que Moesina se localice en la membrana celular.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPy</sup>Gal4>UASMoe-GFP*. Corte transversal localizado abajo. Corte longitudinal localizado a la derecha (apical (dcha)). (A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPy</sup>Gal4>UASMoe-GFP; UASald*. Ald se muestra en rojo (gris en A', B', Dlg en azul y la expresión de Moesina-GFP en verde (gris en A'', B'')). Moesina-GFP se localiza en la membrana celular en el disco control, estando enriquecida en la región apical (A, A'). En los discos en los que se sobre-expresa *ald*, las células con elevados niveles de Ald no presentan Moe-GFP en sus membranas (flechas azules en B, B').

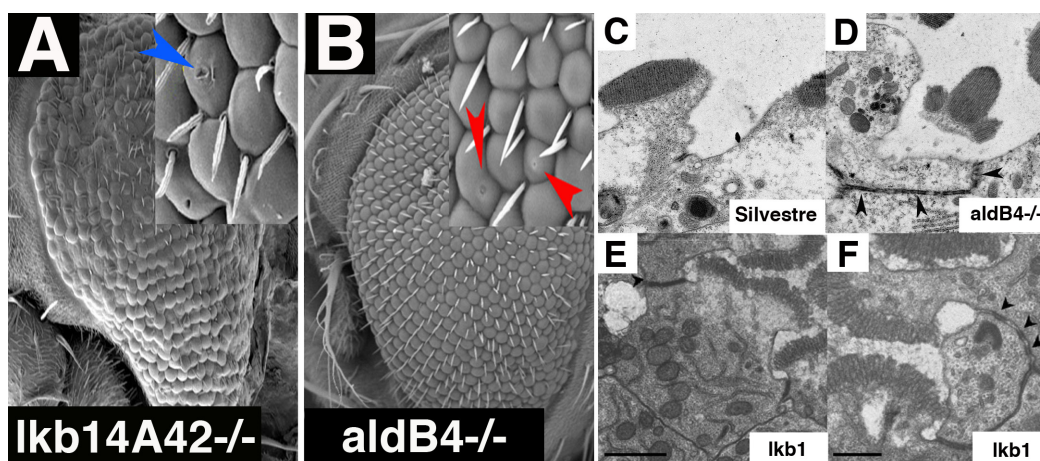
En resumen, nuestros resultados indican que cambios en los niveles de expresión de *ald* modifican la actividad tanto de Moe, como de Rho1. Además, estos datos sugieren que estas proteínas median parte de la función de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial. Así mismo, dado que no conseguimos un rescate total de los fenotipos observados al sobre-expresar *ald*, no podemos descartar la posibilidad de que esta quinasa actúe sobre otras proteínas.

#### 4.3.- Otras posibles rutas de interacción con Ald: LKB1/sqh.

Dado que los mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* presentaban una serie de alteraciones morfológicas muy evidentes, de forma previa al análisis de las interacciones que hemos expuesto con anterioridad, decidimos buscar candidatos que pudieran estar mediando los efectos descritos para la falta de función de *ald* en el ojo. De esta forma, seleccionamos la ruta de la serina treonina quinasa LKB1. Los defectos morfológicos ocasionados por la falta de función de diferentes componentes de esta ruta son similares a los observados en los mutantes homocigóticos de *ald*. Además al igual que Ald, esta ruta se activa en respuesta a estrés (Mirouse, Swick et al. 2007). LKB1 es el ortólogo en *Drosophila* de Par-4 y su función como regulador de polaridad y adhesión celular está ampliamente conservada. Trabajos recientes habían establecido que el principal efector de LKB1 era la quinasa



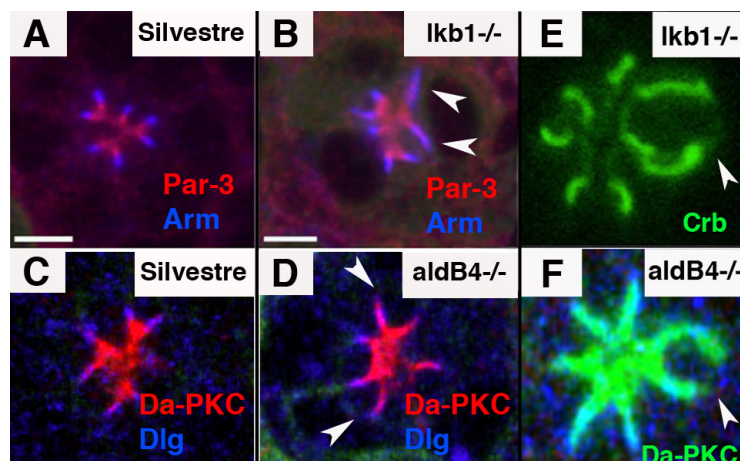
dependiente de AMPK (Mirouse, Swick et al. 2007; Mirouse and Billaud 2011). A su vez, también se había propuesto que Sqh mediaba en último término los efectos de la ruta, ya que la expresión de una forma constitutivamente activa de la proteína (Sqh<sup>EE</sup>) recuperaba totalmente el fenotipo de los clones de falta de función de LKB1 (Mirouse, Swick et al. 2007). Sin embargo, otros estudios han comprobado que la vía opera de forma diferente según el contexto celular, ya que en tejidos complejos como la retina pupal, LKB1 parece ejercer su función a través de múltiples efectores (Amin, Khan et al. 2009). La descripción que se había hecho del fenotipo de falta de función de LKB1 en el ojo adulto coincidía en gran medida con los defectos observados en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. Las dos condiciones de falta de función daban lugar a ojos rugosos de tamaño reducido que presentaban defectos, tanto en la distribución de las quetas y de los omatidios, como en la morfología de estos últimos, ya que en ocasiones aparecían fusionados o con agujeros en la superficie (Fig 54A,B). Un análisis más detallado de la estructura de la retina en secciones ultrafinas de tejido, mostró rabdomeros desestructurados, omatidios formados por un número aberrante de fotorreceptores, tanto por exceso como por defecto y presencia de uniones adherentes ectópicas, fragmentadas o elongadas (Fig 54C,D,E,F).



**Fig 54: Los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> y *lkb1*<sup>4A42</sup> presentan defectos de integridad epitelial similares.**

(A,B) Imágenes de microscopía electrónica de barrido del ojo adulto de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> (A) y *lkb1*<sup>4A42</sup> (B). (C-,F) Secciones ultrafinas realizadas a partir de ojos adultos de los siguientes genotipos: (C) Silvestre, (D) *aldB4*<sup>-/-</sup>, (E,F) *lkb1*<sup>-/-</sup>. Los ojos adultos de los mutantes *lkb1*<sup>4A42</sup> presentan una desorganización de los omatidios mucho más fuerte que la de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>, pero en una ampliación se puede apreciar que ambos presentan los mismos defectos estructurales: defectos en la integridad de la membrana de los omatidios (flecha azul y flechas rojas) y localización ectópica de quetas (A,B). En las secciones ultrafinas se puede distinguir como en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> y *lkb1*<sup>-/-</sup> las uniones adherentes se encuentran elongadas y fracturadas. Las imágenes de los mutantes *lkb1* han sido modificadas de (Amin y col. 2008).

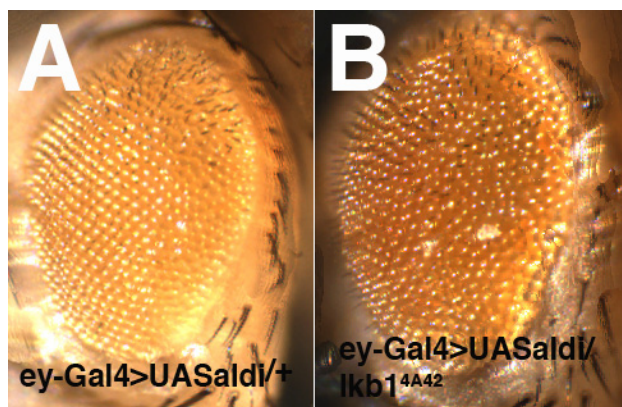
Así mismo, en el epitelio de pupa, también se apreciaron defectos similares a los observados en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. Las retinas pupales mutantes para *lkb1*, presentaban deslocalización y solapamiento de diferentes marcadores de polaridad apico-basal, así como dominios de membrana ectópicos (Amin, Khan et al. 2009) (Fig 55). El análisis de los fenotipos de falta de función de *lkb1* se llevó a cabo utilizando dos alelos diferentes: *lkb1*<sup>4A42</sup>, que es nulo, ya que no se genera proteína al haber sido eliminada la región codificante y *lkb1*<sup>4B1-11</sup>, que expresa una proteína truncada de 98aa y es hipomorfo. Los fenotipos de ambos alelos eran similares, aunque el efecto de *lkb1*<sup>4B1-11</sup> resultaba menos drástico, al igual que el de *aldB4*. De esta forma, teniendo en cuenta la similitud de los fenotipos descritos, nos pareció interesante analizar la posible relación funcional entre Ald y LKB1.



**Fig 55: Los fotorreceptores de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> y *lkb1*<sup>4A42</sup><sup>-/-</sup> presentan los mismos defectos estructurales y de polaridad.**

(A-F) Sección tangencial de omatidios de retina de pupa aislados (A-E) 55% desarrollo, y (C-F) 45% desarrollo. (A,C) silvestre, (B,E) *lkb1*<sup>4A42</sup><sup>-/-</sup>, (D,F) *aldB4*<sup>-/-</sup>. (A-D) La región apical de la membrana está teñida en rojo (Par-3) y la región de las uniones adherentes o del dominio basolateral se muestran en azul (Arm en A;B y Dlg en C,D). (E,F) En verde se muestra el dominio apical de los fotorreceptores (Crb en (E) y Da-PKC en (F)). Se observa extensión anómala del dominio de membrana en el que se localizan las proteínas de polaridad apical Par-3 (B) y Da-PKC (D), y solapamiento con marcadores de localización más basal (Arm (B) y Dlg (D)). Los omatidios mutantes para *lkb1* y *ald* presentan dominios de membrana ectópicos (flechas blancas (E,F)). Las imágenes de *lkb1*<sup>4A42</sup> han sido tomadas de (Amin y cols. 2008).

En primer lugar, dado que se sabe que LKB1 fosforila a sus proteínas diana en una secuencia consenso que ha sido denominada Bucle-T (Alessi, Sakamoto et al. 2006), estudiamos si esta secuencia se encontraba en la proteína Ald. Así, Ald no presentaba en su secuencia dicha región consenso, por lo que no parecía factible que estuviera siendo regulado por LKB1. Además, el hecho de que la activación de LKB1 en el disco de ojo no afecte a la progresión del ciclo, descarta esta posibilidad (Lee, Koh et al. 2006).



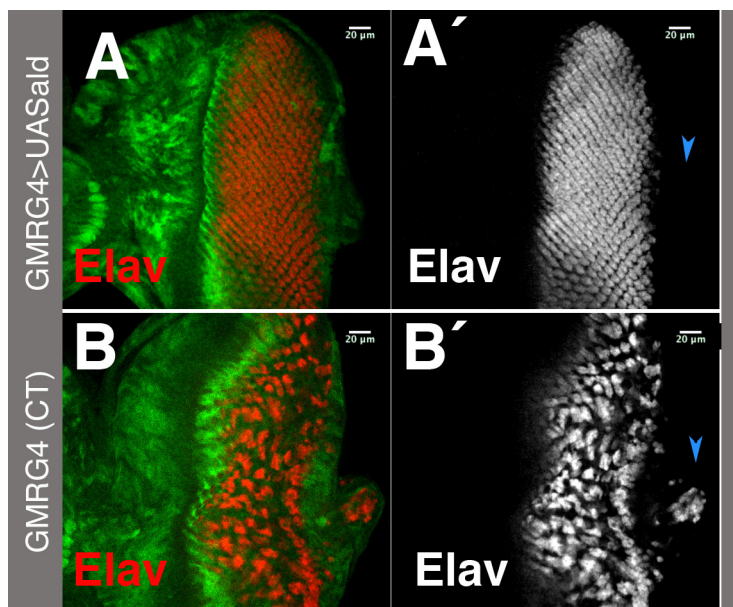
**Fig56. *Ald* y *lkb1* interactúan genéticamente.**

(A) Fotografía del ojo de un adulto del genotipo *ey-Gal4>UASaldl*<sup>ARNi/+</sup>. (B) Ojo de un adulto del genotipo *ey-Gal4>UASaldl*<sup>ARNi/lkb1</sup><sup>4A42</sup>. LA reducción de una dosis de *lkb1* potencia los efectos de la falta de función de *ald*.

Por otro lado, ya que se ha descrito que ambas proteínas actúan en respuesta a estrés (Fischer, Heeger et al. 2004) (Mirouse and Billaud 2011), también cabía la posibilidad de que Ald pudiera estar activando a LKB1 o actuar en paralelo a esta proteína. Para establecer si ambas proteínas estaban relacionadas funcionalmente, estudiamos si existía interacción genética entre ambos genes. Con este fin, eliminamos una dosis de *lkb1*, utilizando el alelo *lkb1*<sup>4A42</sup>, en individuos que expresaban el ARNi de *ald* en el ojo (*ey-Gal4>UAS-ald*<sup>ARNi</sup>). De esta forma, observamos que los ojos de las

moscas *ey-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/lkb1<sup>4A42</sup>* presentaban un fenotipo de ojo rugoso más fuerte que el de las moscas *ey-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/+*, sugiriendo que ambos genes podrían estar mediando procesos similares (Fig 56).

Por otro lado, se sabe que la activación de la vía de LKB1 conlleva una activación de la cadena ligera de la Miosina II (Sqh) (Mirouse, Swick et al. 2007; Mirouse and Billaud 2011) y que la falta de función de *sqh* da lugar a fenotipos similares, aunque más débiles que los producidos por una insuficiencia de *lkb1* (Edwards and Kiehart 1996; Verdier, Guang Chao et al. 2006). Por lo tanto, dado que la actividad de la vía de LKB1 esta asociada con la regulación de esta proteína, el grado de fosforilación de Sqh se puede utilizar como reportero de activación de la misma. Cambios en los niveles de fosforilación de Sqh, se traducen en diferencias en la tensión que mantiene a las células formando parte del epitelio y en su posición correcta. De este modo, un déficit de Sqh o una inactivación de la proteína da lugar a diversos efectos. Por un lado, reduce la tensión existente entre las células, provocando un incremento del diámetro celular apical, lo que a su vez, genera una pérdida de la constricción apical (Escudero, Bischoff et al. 2007). Por otro lado, impide la correcta agrupación de los fotorreceptores y altera la distribución de los omatidios en el plano superficial del epitelio (Escudero, Bischoff et al. 2007). En el caso de la activación ectópica de la proteína, se observa el efecto contrario, se produce un incremento de la constricción apical celular, generando invaginaciones del tejido. Además, cuando la activación afecta a células neuronales, estas se desprenden del epitelio y se retraen hacia la localización de sus terminaciones axonales (Lee, Koh et al. 2006; Escudero, Bischoff et al. 2007). En condiciones de falta de función de *ald* (*aldB4<sup>-/-</sup>*) se observa que tanto en tejidos larvarios como en estadios posteriores se encuentran células localizadas a diferentes niveles. Además, tal y como hemos descrito con anterioridad, es evidente la pérdida del patrón altamente organizado de los omatidios, tanto en los discos imaginales de tercer estadio como en las retinas pupales.



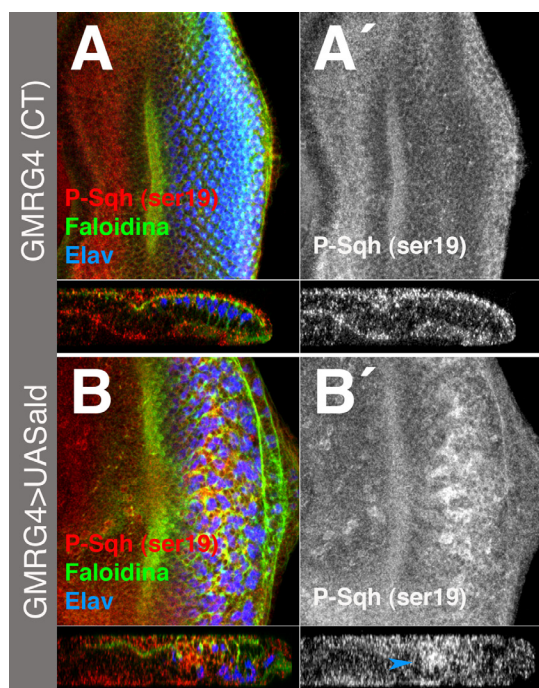
**Fig 57: Los fotorreceptores que sobre-expresan Ald adquieren movilidad y migran hacia el lóbulo óptico.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ojo-antena de tercer estadio larvario del genotipo *GMRGal4* (control) (B) Plano apical de un disco *GMRGal4>UASald*. (A,B) Los fotorreceptores están marcados en rojo (Elav) (gris en (A',B')). A diferencia del control (flecha azul en A,A'), los fotorreceptores en el disco en el que se ha sobre-expresado *ald* (B,B') se observan en la región distal del nervio óptico (flecha azul).

La sobre-expresión de *ald* también da lugar a alteraciones tanto en el patrón como en la distribución de los omatidios, como se evidencia en discos de ojo de larvas *GMR-Gal4>UAS-ald*. A diferencia de lo que ocurre en los discos control, que presentan un borde neuronal bien definido



(Fig 57A,A'), en los discos mutantes observamos que los fotorreceptores se movilizan por el epitelio, llegando a invadir el nervio óptico (Fig 57B,B'). Estos fenotipos, en su conjunto, sugieren que directa o indirectamente, la actividad de Sqh podría estar siendo regulada por Ald. Para comprobar esta posibilidad, estudiamos si el estado de fosforilación de esta proteína variaba en condiciones tanto de sobre-expresión como de falta de función de *ald*. En primer lugar, analizamos si existían cambios en los niveles de P-Sqh (ser19) en condiciones de sobre-expresión de *ald* en los discos *GMR-Gal4>UAS-ald*. Comparados con los discos control, observamos que en los discos que sobre-expresaban Ald existía un marcado incremento en los niveles de P-Sqh (ser19) en la región posterior al surco morfogenético (Fig 58). Este resultado sugiere que Ald es capaz de activar la fosforilación de Sqh, ya sea de forma directa o indirecta. En segundo lugar, analizamos la expresión de P-Sqh en discos imaginales de ojo-antena mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>* y la comparamos con discos silvestres. Para ello, se midieron los niveles de intensidad de fluorescencia en ambas muestras. Si embargo, no pudimos determinar un resultado claro y concluyente, ya que existía una gran variabilidad entre los discos de la misma muestra. Por esa razón, llevamos a cabo un ensayo de Western-blot en el que comparamos la expresión de P-Sqh (ser19) entre discos control y discos mutantes *aldB4<sup>-/-</sup>*, normalizando los resultados frente a la expresión de Tubulina. De esta forma constatamos que no existían diferencias significativas. Este resultado, puede ser debido a redundancia con otras proteínas que actúen sobre Sqh, hecho que ocurre con conocidos reguladores de esta proteína como son Rok y Rak (Neubueser and Hipfner 2010). Por lo tanto, nuestros resultados indican que la sobre-expresión de *ald*, al igual que la activación de LKB1, media la fosforilación de Sqh, apoyando la idea de que ambas proteínas actúan en la misma vía, o en paralelo, regulando procesos comunes.

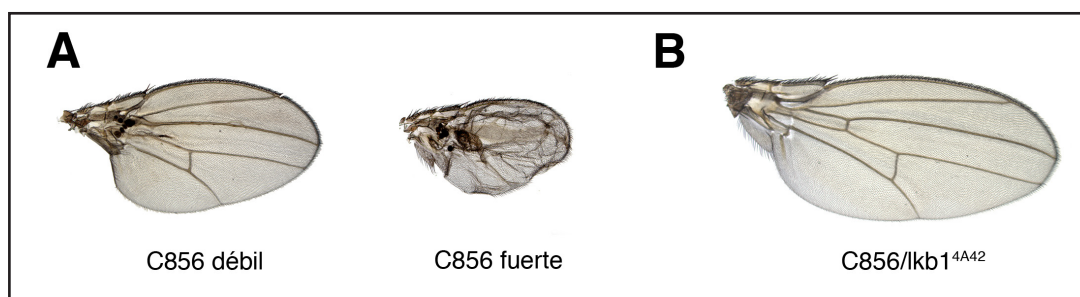


**Fig 58: La sobre-expresión de *ald* da lugar a un incremento de fosforilación de la cadena ligera de la Miosina (Sqh).**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ojo-antena de tercer estadio larvario del genotipo *GMRGal4* (control) y su correspondiente corte longitudinal. (B) Plano apical y corte longitudinal de un disco *GMRGal4>UASald*. (A,B) La forma fosforilada de Sqh-P se muestra en rojo (gris en A'), el citoesqueleto de actina esta marcado en verde (Faloidina) y los fotorreceptores en azul (Elav). En el disco control (A,A'), tras el surco morfogenético los niveles de P-Sqh (ser19) son muy bajos, mientras que en el disco donde se ha sobre-expresado *ald*, se observa un claro incremento de la forma fosforilada de esta proteína.

Puesto que la modulación de la actividad de Sqh no rescata totalmente los fenotipos de falta de función de *lkb1* y de *ald*, ambas proteínas podrían estar actuando sobre un regulador de esta proteína que presente funciones adicionales para mantener la integridad del epitelio. De esta forma

se explicaría la similitud de los fenotipos de falta de función de *ald* y *lkb1*, así como la interacción genética que existe entre las mismas. Puesto que Rho1, al igual que LKB1, media la activación de Sqh (Sawyer, 2009), y de manera independiente, regula la integridad epitelial de la retina de pupa controlando la endocitosis de DE-cad, cabía la posibilidad de que parte de los defectos observados en los mutantes de *lkb1* pudieran ser debidos a la desregulación de Rho1. Si esto fuera así, dado que nuestros resultados indican que Ald está relacionado funcionalmente con Rho1, esta proteína podría ser un efector comunes de Ald y LKB1. Para estudiar esta hipótesis, analizamos si al igual que ocurre con la reducción de una dosis de Rho1, el fenotipo de falta de función de Moe se rescataba en condiciones de heterocigosis para *lkb1*. Para llevar a cabo este experimento, utilizamos el alelo hipomorfo *Moe*<sup>C858</sup> (Molnar and de Celis 2006), que presenta un fenotipo de falta de integridad epitelial en alas adultas. De esta forma, al reducir una dosis de LKB1 en machos *Moe*<sup>C858</sup> el fenotipo de ala se revirtió completamente, obteniendo adultos con alas idénticas a las silvestres (Fig 59). Por lo tanto, este resultado apoya la idea de que LKB1 regula a Rho1. Por lo tanto, a pesar de ser muy preliminares, estos datos sugieren que parte de los defectos observados en condiciones de falta de función de *lkb1* y *ald*, deben estar mediados por la desregulación directa o indirecta de Rho1.



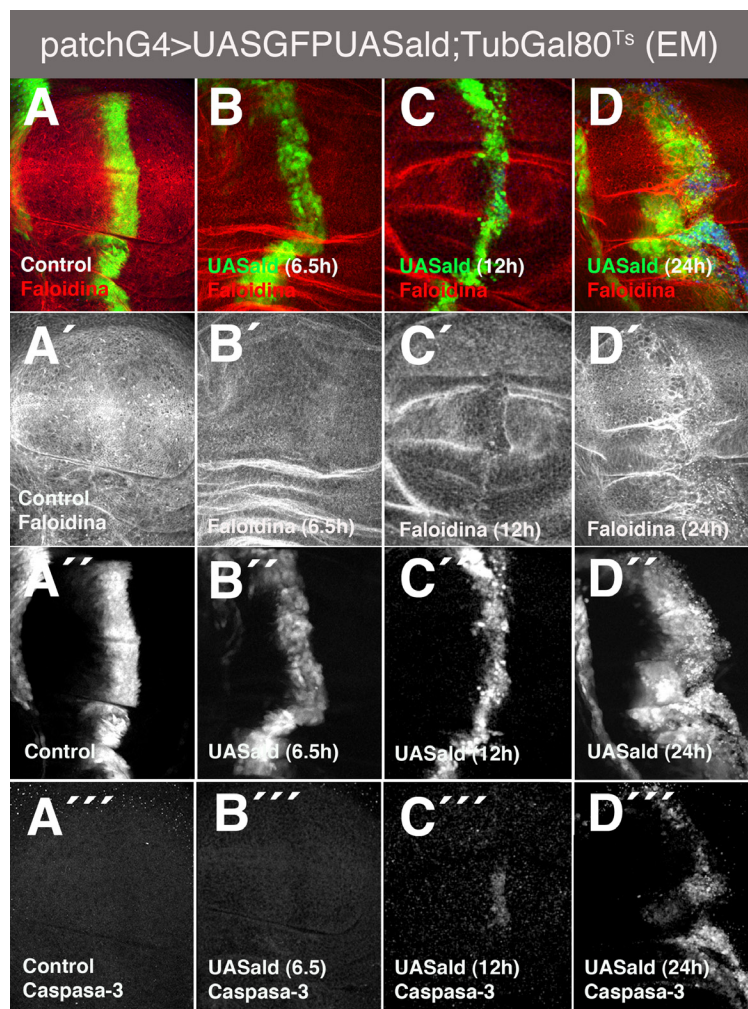
**Fig 59: La reducción de una dosis de *lkb1* rescata totalmente los fenotipo de falta de función de los mutantes *moe*<sup>C856</sup>**

(A) Alas adultas de machos *moe*<sup>C856/C856</sup>. (B) Alas adultas de machos *moe*<sup>C856</sup>; *lkb1*<sup>4A42</sup>. La reducción de una dosis de *lkb1* revierte el fenotipo hipomorfo del alelo *moe*<sup>C856</sup>.

#### 4.4.- Establecimiento del modelo de estudio de la transición epitelio-mesénquima (TEM) ocasionada por la activación de *ald*: Ensayo de movilidad.

La pérdida de integridad epitelial producida al sobre-expresar *ald* en discos *sal<sup>EPn</sup>-Gal4>UAS-ald* ocasiona que algunas células con altos niveles de Ald comiencen a invadir tejidos adyacentes (Fig 44). Para estudiar mejor la dinámica de este proceso, e intentar establecer que factores están siendo alterados por Ald para promover la TEM que hemos descrito con anterioridad, expresamos a Ald de manera controlada, tanto temporal como espacialmente. Para ello, utilizamos el sistema Gal4/UAS en combinación con el Gal80<sup>TS</sup>, cuya transcripción se activa a 18°C-25°C (temperatura permisiva) y se inhibe a 29°C (temperatura restrictiva) (Zeidler, Tan et al. 2004). La proteína Gal80 es capaz de unirse al activador Gal4, impidiendo así la expresión de genes bajo el promotor UAS. Para este estudio, escogimos la línea *ptc-Gal4>UAS-GFP*, cuyo patrón de expresión se delimita a una banda estrecha de células en la región central del disco de ala. Esta expresión tan restringida nos permite visualizar de forma sencilla cambios en el epitelio, así como adquisición de movilidad y capacidad invasiva de las células mutantes (Vidal, Warner et al. 2007).

En primer lugar determinamos el tiempo óptimo de inducción para nuestro ensayo. Para ello, expresamos Ald durante el tercer estadio larvario en periodos variables que oscilaron desde las 6.5h hasta las 72h y llevamos a cabo el análisis de la estructura epitelial (Faloidina, marcador de F-actina) y de la viabilidad celular (Caspasa-3 activada, marcador de muerte celular).



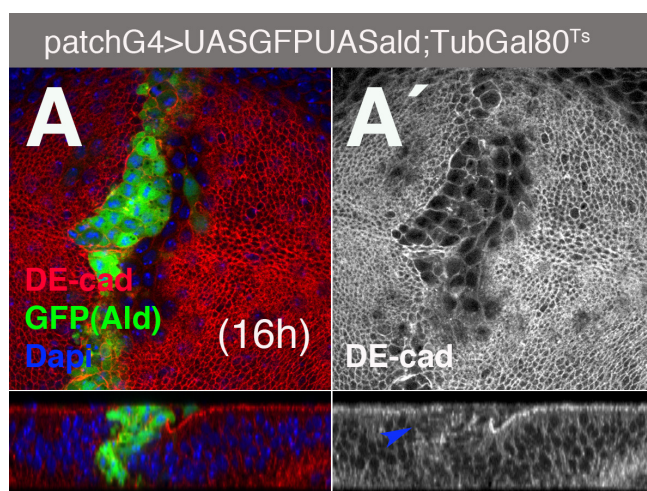
**Fig 60: Caracterización temporal del efecto de sobre-expresión de *ald*.**

(A) Sección tangencial de la región presuntiva del disco imaginal de ala de una larva silvestre (representativa). (B-D) Secciones tangenciales de larvas del genotipo *patchGal4>UASGFP;UASald;TubGal80<sup>TS</sup>* que han sido expuestas a temperatura restrictiva durante 6.5h (B), 12h (C) y 24h (D). El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (A-D) y gris (A'-D'). El dominio de expresión de *patch* se delimita por la expresión de GFP (verde (A-D) y gris (A''-D')). El patrón de muerte celular se muestra por la expresión de Caspasa-3 (Azul (A-D) y gris (A'''-D''')). A las 6.5h las células incrementan su diámetro celular (B,B'), de manera que la banda de células del dominio *patch* pierden el aspecto uniforme que muestra el control (A,A'). En este momento no se observan cambios en el citoesqueleto de actina (B') ni muerte celular (B'''). A las 12h las células comienzan a soltarse y a movilizarse (C,C'), el citoesqueleto de actina se remodela (C) y parte de las células del dominio *patch* comienzan a morir (C'''). A las 24h se observa un incremento en el número de células movilizadas (D,D'), la remodelación del citoesqueleto de actina sigue siendo muy marcada (D') y se incrementa el número de células que han activado la vía apoptótica (D'''), pero todavía gran parte de las células que se movilizan no expresa Caspasa-3.

Al expresar Ald durante 6.5h, se aprecia que las células comienzan a redondearse, disminuye la expresión de Faloidina sutilmente, los núcleos (marcados con Dapi) se encuentran ligeramente deslocalizados y en este momento no existe muerte celular (Fig. 60B). A las 12h de



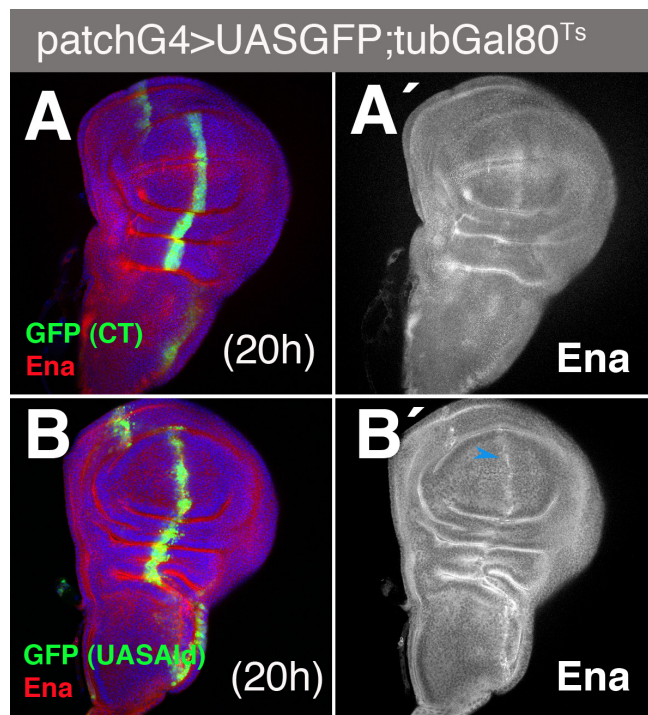
expresión, comienza la movilización celular, el citoesqueleto de actina se desorganiza, apareciendo acúmulos ectópicos de actina, y se aprecia expresión de Caspasa-3, pero de forma muy localizada (Fig. 60C,C',C''). A las 16, 20, 22 y 24h, el fenotipo es similar al descrito a las 12h, pero potenciado según incrementa el tiempo de sobre-expresión. A las 24h, la dispersión celular es muy marcada, alcanzando zonas muy alejadas de la región *ptc-Gal4* (Fig. 60D,D',D''). El número de células que han activado el programa apoptótico en este momento es muy elevado, aunque todavía gran parte de las células que se movilizan no expresan el marcador de muerte celular Caspasa-3 (Fig. 60D). A las 72h, las células que se han desplazado fuera del dominio *ptc-Gal4* en hacia el compartimento posterior (zona donde la diferencia de expresión es más brusca), son positivas para Caspasa-3, mientras que en el otro borde se aprecia movilización celular en ausencia de muerte. Según el análisis temporal de la activación de Ald que acabamos de detallar, concluimos que el tiempo óptimo de expresión de Ald para analizar tanto el efecto de migración celular como la pérdida de integridad epitelial son 24h. A tiempos más cortos no podemos observar movilidad de forma evidente y a tiempos más largos se desestructura demasiado el epitelio como para permitir un correcto análisis.



**Fig 61: La sobre-expresión de *ald* induce pérdida de la expresión de DE-cad a las 16h**

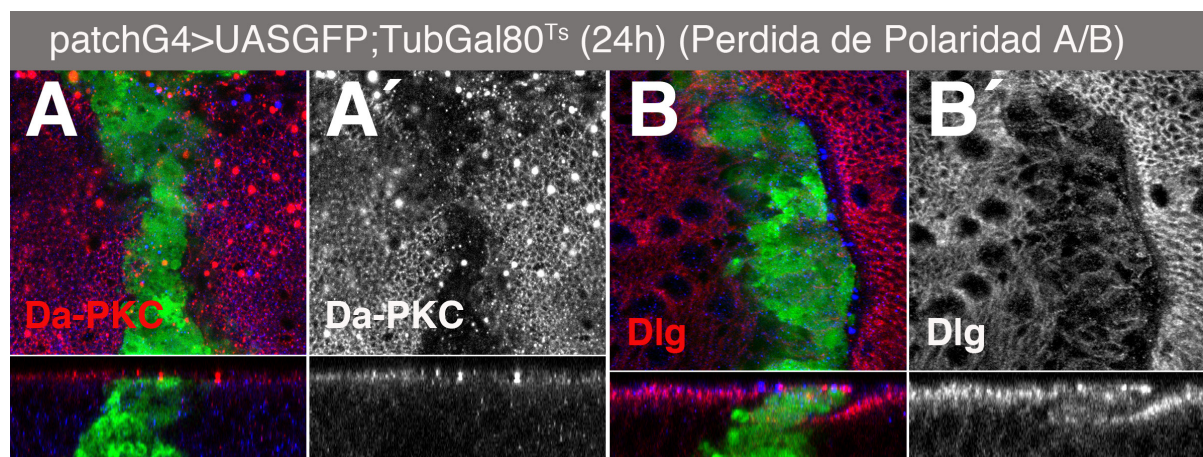
(A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario en el que se ha sobre-expresado *ald* durante 16h en el territorio patch. En la región inferior se presenta un corte transversal del epitelio. DE-cad está marcada en rojo (A) y gris (A'). Las células del dominio patch que expresan Ald a altos niveles se muestran en verde y los núcleos celulares, marcados por Dapi, en azul (A). La expresión de DE-cad desaparece del dominio patch, como se puede ver en el corte transversal (A' (flecha azul)).

Utilizando este sistema, hemos estudiado el patrón de expresión de diferentes proteínas que habíamos comprobado que se alteraban en condiciones de sobre-expresión de *ald* usando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4*. Así, hemos establecido una secuencia temporal de acontecimientos. A las 16h comprobamos que las células que expresan Ald a altos niveles comienzan a perder DE-cad (Fig. 61A,A'). A las 20h, los niveles de Ena se incrementan en el borde entre las células que sobre-expresan Ald y las que no lo hacen (Fig. 62). Este incremento de la proteína suele estar asociado al frente de avance de las células migratorias. A las 24h se observa una clara pérdida de polaridad apico-basal, patente por la falta de Da-PKC y Dlg (Fig. 63).



**Fig 62: La sobre-expresión de *ald*, induce activación de Enabled**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ala del genotipo patchGal4>UASGFP;TubGal80<sup>Ts</sup> (B) Plano apical de un disco imaginal de ala del genotipo patchGal4>UASGFP UAS<sup>ald</sup>;tubGal80<sup>Ts</sup>. Las larvas de ambos genotipos fueron expuestas a 29°C durante 20h. Ena se visualiza en rojo (A,B) y gris (A',B). El dominio de expresión se distingue por la presencia de GFP, verde en (A,B). En los discos en los que se ha sobre-expresado *ald* se observa un incremento de los niveles de la proteína en uno de los bordes de confrontación entre las células del territorio patch y las células silvestres (flecha azul en B').



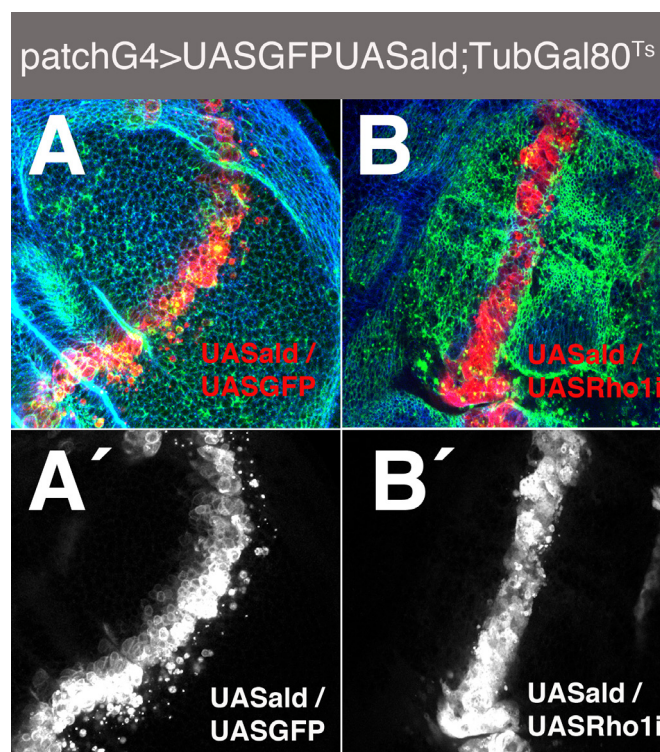
**Fig 63: A las 24h de sobre-expresión de *ald* se observa una pérdida total de polaridad apico-basal.**

(A,B) Magnificación del plano apical (región central) de discos imaginales de ala de tercer estadio larvario del genotipo patchGal4>UASGFP UAS<sup>ald</sup>;tubGal80<sup>Ts</sup>. El corte transversal se localiza en el panel inferior de la figura. Las larvas de este genotipos fueron expuestas a 29°C durante 24h. La expresión de Da-PKC se muestra en rojo (A) y gris (A'). La expresión de Dlg se muestra en rojo (B) y gris (B'). A diferencia del territorio silvestre, en la región patch las células pierden completamente la expresión de Da-PKC (A,A'). En el caso de Dlg se observa el mismo efecto (B,B').

Una vez puesto a punto el sistema, analizamos el efecto de la modulación de la actividad de aquellos factores que podrían estar mediando la función de Ald en el mantenimiento de la integridad epitelial y en la adquisición de movilidad celular. Hasta el momento hemos observado que el fenotipo de los discos *ptc-Gal4>UAS-GFP; UAS-ald* tras 24h a temperatura restrictiva es parcialmente rescatado por varios candidatos. La sobre-expresión de un ARNi específico para



Rho1 bloquea completamente el fenotipo de invasión observado al sobre-expresar Ald, aunque no rescata los defectos de integridad epitelial (Fig 64). De la misma forma, la inhibición de la vía JNK, mediada por la sobre-expresión de *UAS-p $\mu$ <sup>2A</sup>*, así como la expresión ectópica de DE-cad (*UAS-shotgun*) dan lugar al mismo efecto. Por lo tanto, parece que la adquisición de capacidad invasiva por parte de las células que presentan elevados niveles de Ald depende de la activación de Rho1 y JNK. Así mismo, el incremento de DE-cad debe estabilizar las uniones entre las células, impidiendo que se suelten y migren. Dado que los defectos de integridad epitelial no se modifican al bloquear cada uno de estos genes de forma independiente, Ald deber estar modulando la actividad de varios factores simultáneamente.



**Fig 64: La reducción de los niveles de Rho1 rescata la migración celular observada al sobre-expresar *ald*.**

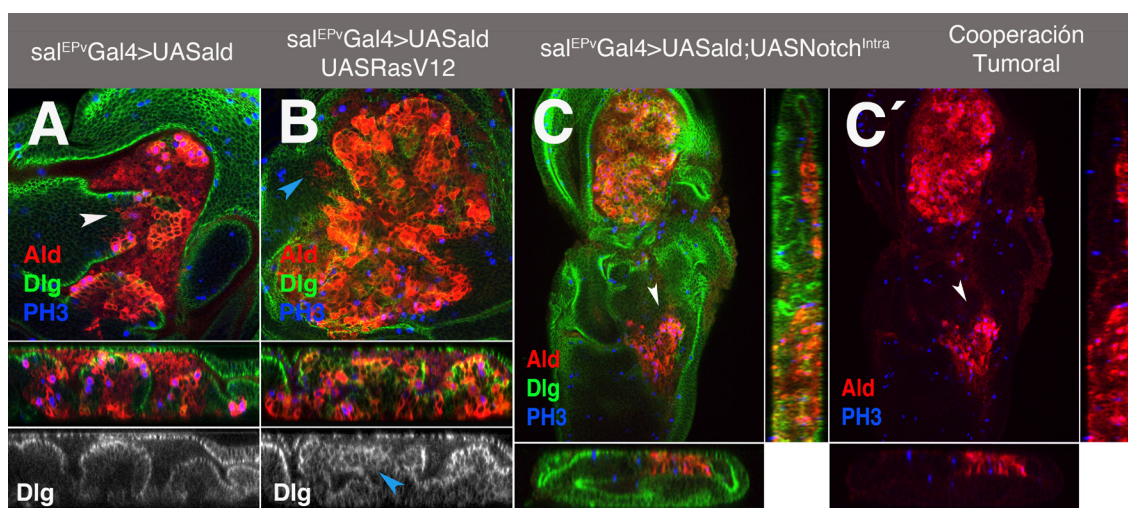
(A) Sección tangencial de la región presuntiva de ala de un disco imaginal de tercer estadio larvario del genotipo *patchGal4>UASGFP UASald;tubGal80<sup>TS</sup>/UASGFPmCD8*. (B) Sección tangencial de un disco *patchGal4>UASGFP UASald;tubGal80<sup>TS</sup>/UASRho1ARNi*. Las larvas de ambos genotipos fueron expuestas a 29° durante 24h. (A,B) El epitelio está marcado en azul (Faloidina) y las células del dominio patch se muestran en rojo (gris en (A',B')). Los discos que sobre-expresan *ald* presentan células sueltas alejadas de la banda central de expresión de patch (A,A'), mientras que en los discos en los que se co-expresa Rho1RNAi se bloquea por completo la movilidad celular (B').

## 5.- ENSAYOS DE COOPERACIÓN TUMORAL.

### 5.1.- Ensayo de cooperación tumoral con la ganancia de función: Interacción Ald/EGFR-Notch.

Varios trabajos han descrito la cooperación oncogénica existente entre mutaciones que dan lugar a pérdida de polaridad (*dlg*, *lgf*, *scrib*) y la activación de las vías del EGFR o Notch (Dow, Elsum et al. 2008; Wu, Pastor-Pareja et al. 2010). Por un lado, la expresión de una forma activada de Ras

(Ras<sup>V12</sup>) o de Notch (N<sup>intra</sup>) da lugar a sobrecrecimientos, pero las células que forman parte de los mismos no son invasivas (Wu, Pastor-Pareja et al. 2010). Por otro lado, se sabe que larvas homocigóticas para la falta de función de *scribble* (*scrib*) o *lethal giant larvae* (*lgl*) presentan discos sobrecrecidos, mientras que las mismas células rodeadas por tejido silvestre, son eliminadas por competición celular (Elsom, Yates et al.). En cambio, cuando se inducen clones en el disco de ojo que pierden la expresión de Scribble y expresan Ras<sup>V12</sup> o Notch, las células invaden territorios adyacentes, dando lugar a metástasis (Wu, Pastor-Pareja et al. 2010). Considerando que la sobre-expresión de Ald da lugar a pérdida de integridad epitelial e induce movilidad celular, analizamos si la combinación de UAS-*ald* y UAS-Ras<sup>V12</sup> o UAS-N<sup>intra</sup>, daba lugar a sobrecrecimientos invasivos. Para ello, en primer lugar co-expresamos Ald y Ras<sup>V12</sup> en el disco de ala utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4*. Cuando se analiza el epitelio en estos discos, se observa un mayor número de células que invaden los territorios adyacentes y que se intercalan entre las células silvestres (Fig 71 A). Al combinar la sobre-expresión de Ald con N<sup>intra</sup> se obtuvo un resultado similar, aunque, en este caso, algunos discos presentaban grupos de células en la región presuntiva del tórax (Fig 65B,B'). Estas células se localizaban entre las dos capas apicales del epitelio y de la membrana peripodial y parecía ser el resultado de una metástasis local (Fig 65B, B'). Por lo tanto, podemos establecer que la expresión conjunta de Ald y de las formas oncogénicas (Ras<sup>V12</sup> y N<sup>intra</sup>) da lugar a un incremento en el número de células con capacidad invasiva que se generan por la sobre-expresión de *ald*, aunque estas células nunca llegan a invadir otros discos.

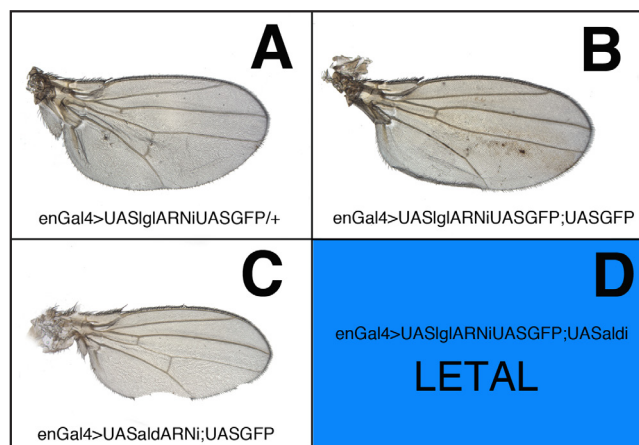


**Fig 65: Ensayo de cooperación tumoral entre *ald* y los oncogenes Ras<sup>V12</sup> y Notch<sup>intra</sup>**

(A) Plano apical de la región presuntiva de ala de un disco imaginal de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald* (B) y *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald/UASRas<sup>V12</sup>*. (A,B) Los cortes transversales se localizan abajo. (C) Plano apical de un disco imaginal de tercer estadio larvario del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;UASNotch<sup>intra</sup>*. Debajo se muestra el corte transversal del tejido, mientras que el corte longitudinal se localiza a la derecha. (A-C) Las células que sobre-expresan *ald* están marcadas por la presencia de altos niveles de Ald (rojo), el epitelio se muestra en verde (Dlg) y las células en división están marcadas por PH3 (azul). La sobre-expresión de *ald* induce muerte celular (ver fig 42) y genera células con capacidad invasiva (flecha blanca (A,B)). Cuando se combina la expresión de Ald con la del oncogen Ras<sup>V12</sup>, se incrementa el número de células que tienen capacidad invasiva. En este disco se aprecian grupos de células alejados del territorio sal (flecha azul en B). En el corte transversal se pueden ver células que presentan Dlg distribuido por toda la membrana (Flecha azul en B). La combinación con Notch<sup>intra</sup> da lugar al mismo incremento en el número de células con capacidad invasivas, y se observa migración hacia regiones alejadas (en este caso el notum del ala (flecha blanca en C). Estas células se movilizan entre la región apical del epitelio propio y la de la membrana peripodial (Cortes transversal y longitudinal en C).

## 5.2.- Ensayo de cooperación tumoral con la falta de función. Interacción: *ald/lgl*.

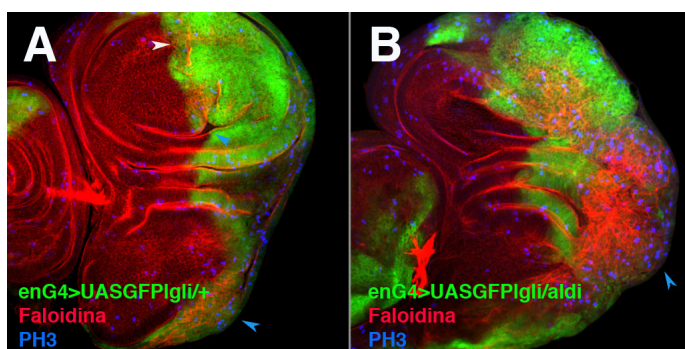
Hemos mostrado como la falta de función de Ald afecta a la integridad epitelial e induce pérdida de polaridad apico-basal, siendo este efecto dependiente de dosis. Por este motivo, nos preguntamos si en un fondo sensibilizado podríamos ver un efecto sinérgico de la falta de función de *ald*. Para ello, analizamos el efecto de la combinación de una reducción de los niveles de expresión de *ald* con una falta de función de *lgl*. Al reducir Lgl en el compartimento posterior, mediante la expresión de su ARNi (*en-Gal4>UAS-GFP/UAS-lglARNi* a 29°C), los adultos presentan alas sobrecrecidas en la región posterior y con defectos epiteliales sutiles (Fig. 66 A,B).



**Fig 66: Efecto sinérgico de la falta de función de *lgl* y *ald*.**

(A) Ala adulta del genotipo *enGal4>UASlglARNi UASGFP*. (B) Control de dosis de UAS del ala adulta *enGal4>UASlglARNi UASGFP/UASGFP*. (C) Ala adulta del genotipo *enGal4>UASald<sup>ARNi</sup>;UAS GFP*. (D) Efecto de la combinación de la falta de función de *lgl* y *ald*. (Enayo realizado a 29°C)

Cuando analizamos los discos correspondientes a ese genotipo, se apreciaron focos de pérdida de integridad epitelial localizados en la región presuntiva del tórax y de la axila (Fig 67A). También es frecuente observar surcos paralelos al borde del compartimento antero-posterior. En el caso de la reducción de *ald*, tal y como se ha descrito previamente, los adultos presentaban una disminución del tamaño del compartimento posterior con defectos sutiles de las venas y muescas en el borde del ala (Fig. 66B).



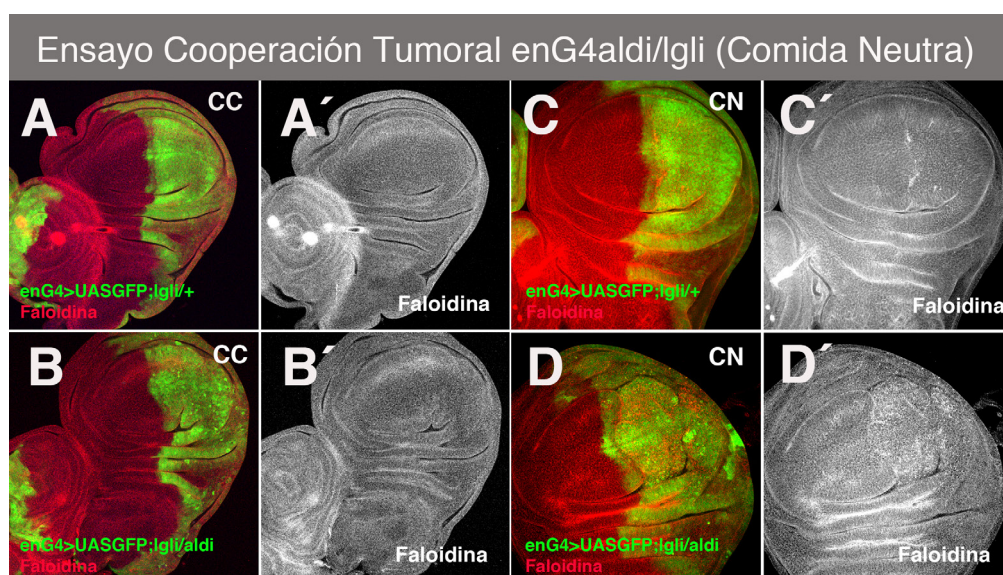
**Fig 67: La combinación de la falta de función de *lgl* y *ald* da lugar a sobrecrecimientos. (Ensayo realizado a 29°C)**

(A) Plano apical de un disco de genotipo *enGal4>UASlglARNi UASGFP/+*. (B) Plano apical de un disco de genotipo *enGal4>UASlglARNi UASGFP/UASald<sup>ARNi</sup>*. El dominio de expresión de los ARNi's esta marcado en verde por la expresión de la proteína GFP. El citoesqueleto de actina está marcado en rojo (Faloidina) y las células en división en azul (PH3). La reducción de los niveles de *lgl* genera surcos en el epitelio (flechas blancas en A) y cambios en la morfología celular de las células de la región basal del notum (flecha azul en A). La expresión conjunta del ARNi de *ald* y de *lgl* da lugar a sobre-crecimientos en los que se incrementan los niveles de actina (flecha azul en B).



En cuanto al fenotipo de los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* a 29°C, el efecto producido en el epitelio fue similar al observado en los discos *en-GFP>UAS-lglARNi*. En cambio, en el caso de la combinación *en-Gal4>UAS-lglARNi;UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* no se obtuvieron adultos, siendo letal en estadio de pupa. Cuando se analizaron los discos correspondientes a este genotipo, se pudo observar un efecto sinérgico de grado variable, apreciándose desde un incremento notable de la desestructuración del epitelio hasta sobre-crecimientos que abarcaban todo el compartimento posterior (Fig 67B). Por lo tanto, estos resultados indican que los fenotipos producidos por una insuficiencia de *lgl* se potencian de manera drástica cuando disminuyen los niveles de Ald. Dada la relación que existe entre el mantenimiento de las propiedades epiteliales y la progresión tumoral, parece que la inhibición de Ald daría lugar a una mayor predisposición para el desarrollo de tumores.

Estos resultados fueron obtenidos durante una estancia en otro laboratorio, y al tratar de reproducirlos en nuestro laboratorio, no obtuvimos el mismo resultado. Así, encontramos que a pesar de que las larvas *en-Gal4>UAS-lglARNi; UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* (29°C) seguían muriendo durante estadios pupales, sus discos en tercer estadio no presentaban los sobre-crecimientos descritos anteriormente. Estos discos mostraban alteraciones en el citoesqueleto de actina en la región del tórax, y la región de la axila aumentaba sutilmente de tamaño, pero en ningún caso estaban sobre-crecidos (Fig 68 A y 69 A).

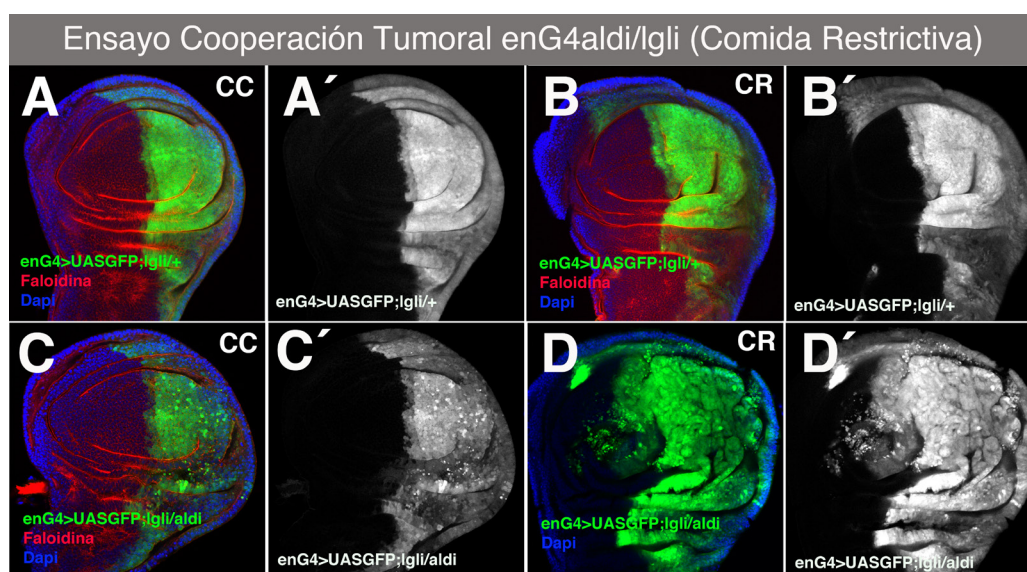


**Fig 68: Ensayo de cooperación tumoral (Estrés metabólico/Comida Neutra).**

El ensayo se llevó a cabo a 29°C. Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario de los genotipos *enGal4>UASlglARNi UASGFP/+* (A y C) y *enGal4>UASlglARNi UASGFP/UASald<sup>ARNi</sup>* (B y D). (A,B) Larvas crecidas en Comida del Centro. (C,D) Larvas crecidas en Comida Neutra (CN). El citoesqueleto de actina se muestra en rojo (A-D) y gris (A',B' y C',D'). El compartimento posterior, donde se expresan las diferentes combinación de ARNi's está marcado en verde (GFP). Al comparar los discos (A,A') con los (C,C') se aprecia como el desarrollo en CN da lugar a incrementos de acúmulos de actina, un efecto típicamente asociado a la pérdida de integridad del epitelio. El ARNi de *ald* produce efectos similares (datos no mostrados). El efecto sinérgico observado en la condición anterior, es más drástico en la combinación genética de falta de función de *lgl* y *ald* (B',D'). Nota: El fenotipo de falta de función de *lgl* se analiza sin añadir una copia extra de *UASGFP*, por lo que el hecho de ver un efecto sinérgico en la combinación con el ARNi de *ald* es más significativo.

Los discos de las larvas *en-Gal4>UAS-lglARNi/UAS-GFP* y *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* (29°C) no mostraron alteraciones epiteliales significativas. Tras varios intentos de reproducir los

resultados iniciales sin éxito, tratamos de encontrar posibles explicaciones para las discrepancias observadas. Dado que los stocks utilizados eran los mismos, las causas de estas diferencias debían radicar en el medio y las condiciones en las que se desarrollaban las puestas. Trabajos previos habían descrito que en condiciones de estrés metabólico se potencia el fenotipo de pérdida de integridad epitelial en diferentes condiciones de falta de función (Mirouse, 2007). Así, para comprobar si la inducción de estrés metabólico era la causa de las diferencias observadas en nuestros ensayos, crecimos larvas de las distintas combinaciones genéticas que pretendíamos analizar en comida restrictiva, en la que se redujo la concentración de glucosa y de extracto de levadura en distintos porcentajes (ver Materiales y Métodos). En primer lugar, analizamos el efecto de lo que denominamos comida neutra (CN), siendo una condición restrictiva suave. En estas condiciones, comprobamos que tanto el fenotipo de los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* como el de *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-lgl/ARNi* se potenciaban ligeramente (Fig 68). Los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-lgl/ARNi* mostraron un surco perpendicular al borde dorsal-ventral muy marcado, la axila era ligeramente más grande, pero la integridad epitelial no estaba afectada (Fig 68). En el caso de la combinación de la falta de función de ambas proteínas, el fenotipo resultante también era más drástico que en los discos de larvas alimentadas con el medio común estándar (comida del centro). Así, encontramos que en estos discos la integridad del epitelio estaba alterada, las células se redondeaban y presentaban un incremento de los niveles de actina, además de acúmulos ectópicos de la misma (Fig 68).



**Fig 69: Ensayo de cooperación tumoral (Estrés metabólico/Comida Restrictiva)**

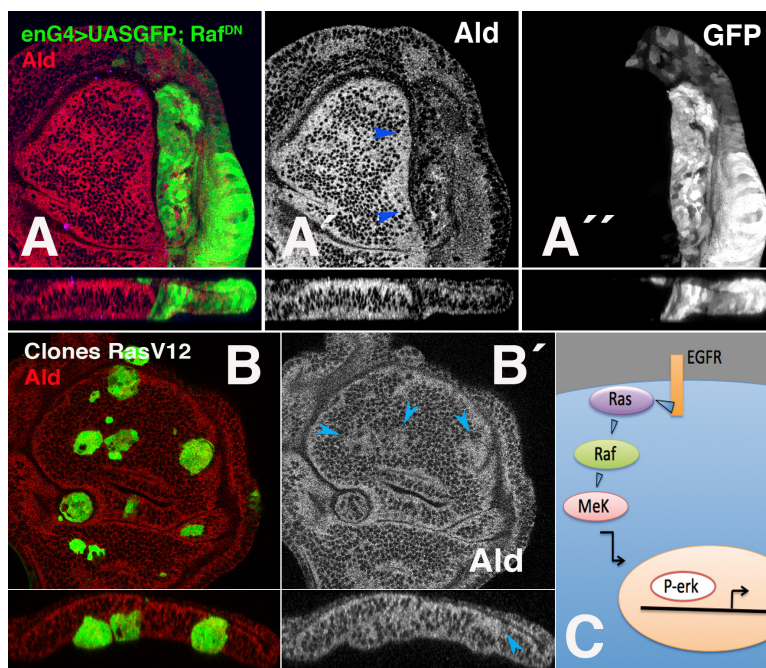
El ensayo se llevó a cabo a 29°C. Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario de los genotipos *enGal4>UASlglARNi UASGFP/+* (A y C) y *enGal4>UASlglARNi UASGFP/UASald<sup>ARNi</sup>* (B y D).. (A,C) Larvas crecidas en Comida del Centro (CC). (B,D) Larvas crecidas en Comida Restrictiva (CR). (A-D) El citoesqueleto de actina se muestra en rojo y los núcleos celulares, teñidos con el marcador nuclear Topro, en azul. Las células del compartimento posterior (GFP positivas) se muestran en verde (A-D) y en gris (A'-D'). Al comparar los discos (A,A') con los (B,B') se aprecia como el desarrollo en CR potencia los defectos ocasionados por el ARNi de *lgl* sobre la integridad del epitelio (formación de surcos). El efecto del ARNi de *ald* es similar (datos no mostrados). Cuando se elimina de manera conjunta la expresión de *ald* y *lgl* el efecto sinérgico de la comida restrictiva es mucho más drástico ((C,C') frente a (D,D')). El 100% de los discos *enGal4>UASlglARNi UASGFP/UASald<sup>ARNi</sup>* muestran sobre-crecimientos en el compartimento posterior (D').

Para analizar si el nivel de estrés metabólico se correlacionaba con el grado de potenciación del fenotipo, repetimos el ensayo utilizando una condición aún más restrictiva (CR). En este caso, tanto los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-lglARNi*, como los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* mostraron una potenciación del fenotipo observado con CN, aunque el epitelio seguía presentando un aspecto bastante normal (Fig 69). En cambio, el efecto sinérgico observado en los discos *en-Gal4>UAS-GFP;UAS-lglARNi/UAS-ald<sup>ARNi</sup>*, reprodujo los sobre-crecimientos que obtuvimos durante la estancia en el otro laboratorio (Fig 69D,D). El hecho de que la falta de función de *lgl* y de *ald* respondan de manera similar, descarta que el efecto de la restricción metabólica actúe de forma específica sobre Ald o sobre Lgl. Estos resultados, sugieren que el estrés metabólico es un mecanismo de control adicional para el mantenimiento de la integridad epitelial en determinados contextos genéticos. Además, en este caso, de forma independiente al estado nutricional de las moscas, hemos demostrado que existe un efecto sinérgico entre la falta de función de *ald* y de *lgl*, por lo que una reducción de los niveles de Ald, es capaz por sí sola de sensibilizar el epitelio y potenciar el efecto de otras mutaciones. Así mismo, hemos encontrado un modelo de progresión tumoral con el que se podrían determinar combinaciones genéticas susceptibles a cambios en los niveles de energía.

## 6. REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE ALD A TRAVÉS DE LA RUTA DEL EGFR.

Para entender mejor cual es la función de Ald, no sólo hemos analizado los distintos efectos ocasionados cuando modificamos sus niveles, sino que también hemos estudiado como podría estar siendo regulado. Distintos estudios realizados en cultivos celulares humanos, han descrito que los niveles del ortólogo de Ald en humanos (Mps1/TTK) se incrementan en líneas tumorales que presentan una forma activada de Raf (Raf<sup>V600E</sup>) (Liu, Cheng et al.). Dicho incremento es debido a la estabilización de la proteína y no a la regulación transcripcional de *ald* (Liu, Cheng et al.). Por lo tanto, nos preguntamos si esta relación funcional estaría conservada evolutivamente y decidimos analizar si existían cambios similares en *Drosophila*. Así pues, sobre-expresamos una forma dominante negativa de Raf (Raf<sup>DN</sup>) en el compartimento posterior del ala y analizamos la expresión de la proteína con un anticuerpo específico contra Ald. Al analizar los discos *en-Gal4>UAS-GFP; UAS-Raf<sup>DN</sup>*, se apreció una clara reducción de los niveles de Ald, correspondiéndose con el territorio de sobre-expresión de Raf<sup>DN</sup> (Fig 70 A,A'). Estos resultados sugieren que la actividad de Raf no solo estabiliza y activa a Ald en condiciones tumorales, sino que es necesaria para mantener los niveles normales de la proteína en el epitelio. Dado que Raf es un componente de la vía de señalización EGFR, nos preguntamos si la activación de un regulador que actúe a otros niveles dentro de esta ruta tendría un efecto similar o si este era específico de Raf. De esta forma, expresamos una forma constitutivamente activa de Ras (Ras<sup>V12</sup>) en el dominio *engrailed* a 18°C, ya que a 25°C es letal embrionario. En este caso, los discos no presentaron ninguna diferencia patente entre el compartimento anterior y posterior. Para descartar que fuera un artefacto de la temperatura, ya que el epitelio del disco presentaba un aspecto normal, indujimos clones de sobre-expresión de Ras<sup>V12</sup> y mantuvimos las larvas a 25°C. En este caso, al analizar el efecto de los clones, sí que encontramos un incremento de los niveles de Ald, aunque el efecto fue heterogéneo (Fig 70B,B'). Por lo tanto, este resultado parece indicar que la vía de señalización del EGFR regula los niveles de Ald, y que no es un efecto específico de Raf. Además, nuestros datos demuestran que dicha regulación esta conservada evolutivamente.

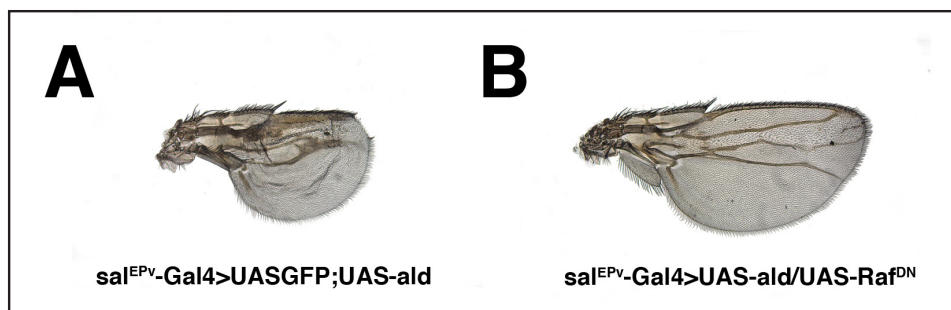




**Fig 70: La vía del EGFR regula los niveles de Ald.**

(A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario (crecido a 18°C) del genotipo *enGal4>UASGFP;UASRaf<sup>DN</sup>* y corte transversal del mismo (región inferior de la figura). El dominio de expresión de engrailed está marcado por la presencia de GFP (verde en (A) y gris en (A')). Ald se muestra en rojo en (A) y gris en (A'). Los niveles de Ald se reducen notablemente en el compartimento posterior, donde se ha inhibido el oncogen *raf* (A'). (B) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario en el que se han inducido clones *Ras<sup>V12</sup>* (FLP/OUT) a las 72h tras la puesta del huevo y se han disectado a las 144h. En la región inferior de la imagen se muestra el corte transversal del tejido. Los clones son GFP positivos (B). Ald se muestra en rojo (B) y gris (B'). El efecto de los clones sobre los niveles de Ald es variable. En la región presuntiva del ala, se visualizan tres clones (marcados por flechas azules (B')) en los que se acumula Ald. (C) Esquema simplificado de la activación de la vía del EGFR.

Tras comprobar que la regulación de los niveles de Ald por la vía EGFR está conservada, nos preguntamos si este efecto tendría una repercusión funcional. Puesto que la activación de la vía incrementa los niveles de Ald y una inhibición los reduce, pensamos que la expresión de *Raf<sup>DN</sup>* debería modular el efecto de sobre-expresión de *ald*. De esta forma, al sobre-expresar *Raf<sup>DN</sup>* y Ald en discos *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald/UAS-Raf<sup>DN</sup>* obtuvimos un rescate significativo del fenotipo de las alas *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald/UASGFP*, recuperándose el tamaño del ala y parte de los defectos de integridad epitelial que presentan (Fig 71).



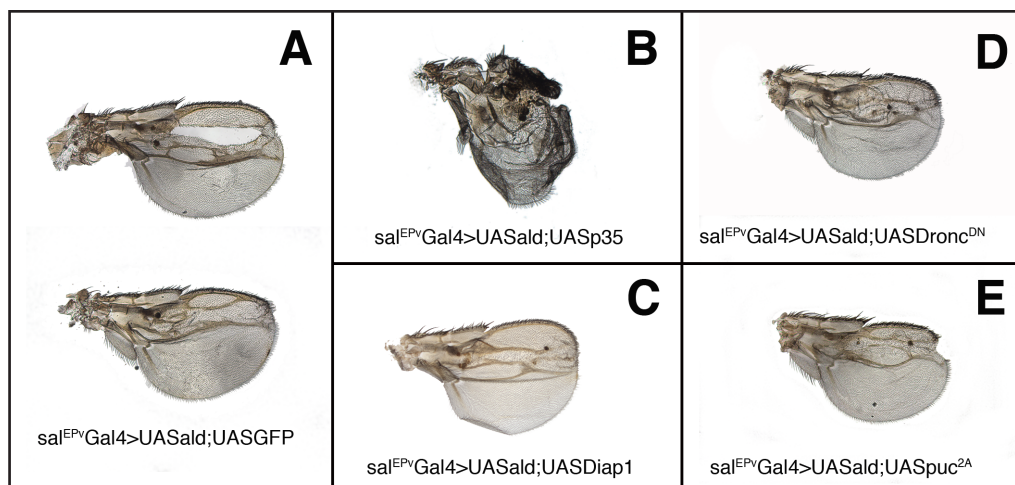
**Fig 71: La inhibición de la vía del EGFR rescata parcialmente el fenotipo de sobre-expresión de *ald***  
(A) Ala adulta del genotipo *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;UASGFP*. (B) *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;UASRaf<sup>DN</sup>*.



Por lo tanto, este resultado confirma que Raf además de regular los niveles de Ald en el epitelio, también es capaz de regular su función, al igual que ocurre con su homólogo en vertebrados (Mps1/TTK).

## 7.- FUNCIÓN DE *ALD* EN EL CONTROL DE LA MUERTE CELULAR.

Uno de los efectos causados por la sobre-expresión de Ald es un fuerte incremento de la muerte celular. Para analizar en que grado los fenotipos producidos por la sobre-expresión de Ald se debían a este efecto, co-expresamos diferentes inhibidores de muerte celular en el ala utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4* (Fig. 72). Así, observamos que la expresión de UAS-p35, que inhibe la actividad de las caspasas efectoras, no rescataba los defectos ocasionados por la sobre-expresión de *ald*, sino que daba lugar a alas con defectos no autónomos, que pueden ser debidos a la generación de “células no muertas” (Perez-Garijo, Martin et al. 2004; Perez-Garijo, Martin et al. 2005) (Fig 72A,B).

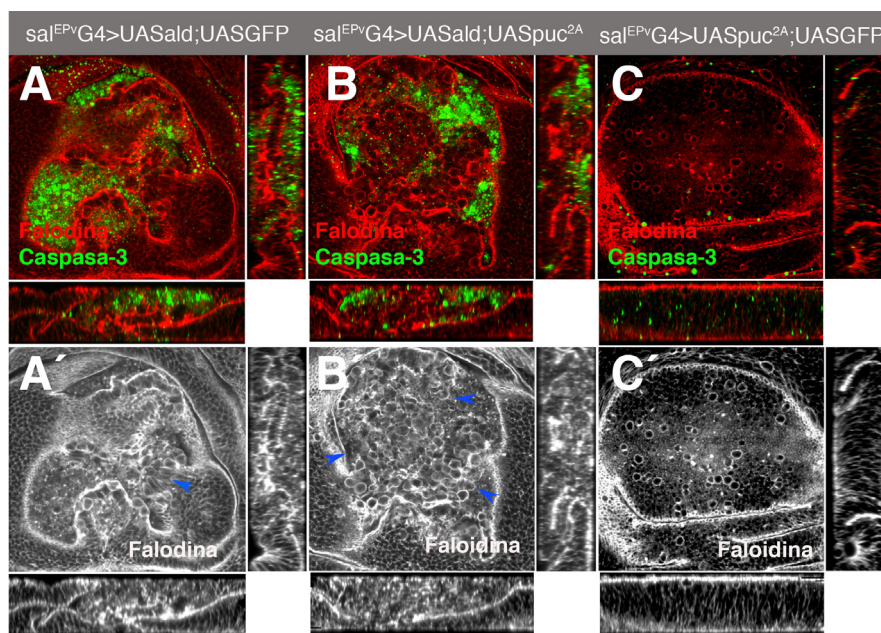


**Fig 72: La co-expresión de inhibidores de muerte celular no rescata el fenotipo de sobre-expresión de *ald*.**

(A) Fenotipo de ala adulta de la sobre-expresión de *ald* en el territorio *sal* a 25°C. (B) La co-expresión de p35 no rescata el fenotipo de causado al sobre-expresar *ald*. (C) Rescate sutil al sobre-expresar el inhibidor de muerte celular Diap1. La co-expresión de Dronc (D) y el inhibidor de la ruta de las JNK, *puckered*, (E) junto con *ald*, no modifica el fenotipo de sobre-expresión de este último

En el caso de la co-expresión de Diap-1, se apreció un rescate sutil, recuperándose parte de las venas comprendidas en el territorio de expresión de *sal<sup>EPv</sup>-Gal4*, aunque estas alas seguían teniendo un tamaño reducido y presentaban defectos en el patrón (Fig 72C). Se obtuvo el mismo resultado cuando se co-expresó una forma dominante negativa del activador de las caspasas efectoras Dronc (*Dronc<sup>DN</sup>*) (Fig 72D). Considerando que la vía JNK se activa en respuesta a la sobre-expresión de Ald, y que la activación de esta vía se ha relacionado con la inducción de muerte celular, nos planteamos si su inhibición podría rescatar el efecto de muerte celular inducido por la sobre-expresión de Ald. De esta forma, para inhibir la ruta JNK, por un lado expresamos una forma dominante negativa de la quinasa efectora basket (*Bsk<sup>DN</sup>*), y por otro, la fosfatasa *Puckered* (*Puc*), que es un regulador negativo de la vía. En ambos casos el análisis del fenotipo de las alas adultas no mostró un rescate del fenotipo de sobre-expresión de Ald. Sin embargo, a pesar de esta

falta de rescate en el ala adulta, al analizar la estructura epitelial de los discos imaginales de tercer estadio larvario del mismo genotipo, observamos cierto grado de recuperación (Fig 73). Los discos *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald/UAS-puc<sup>2A</sup>*, comparado con los discos *sal<sup>EPv</sup>-Gal4>UAS-ald*, presentaron un marcado incremento del número de células grandes y redondas, y una reducción de los niveles de Caspasa-3 (Fig 73 A,B). Por lo tanto, estos resultados indican que la inhibición de la ruta JNK es capaz de revertir parcialmente el efecto de muerte celular producido por la sobre-expresión de Ald. Además sugieren que la inducción de muerte celular, causada por la sobre-expresión de Ald, debe producirse por distintos mecanismos.



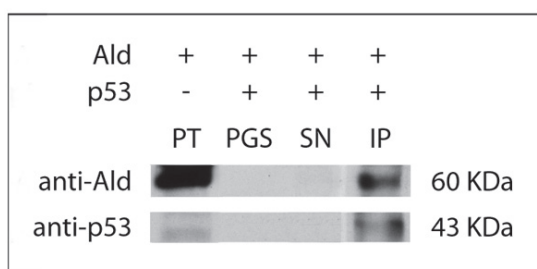
**Fig 73: La inhibición de la vía de las JNK rescata parcialmente la viabilidad de las células que sobre-expresan *ald*.**

(A) Sección del plano medio de discos de tercer estadio larvario de los genotipos *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;UASGFP* (B), *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASald;UASpuc2A* y *sal<sup>EPv</sup>Gal4>UASGFP;UASpuc2A* (C). La imagen de la sección tangencial se acompaña de un corte transversal (localizado debajo) y un corte longitudinal (localizado a la derecha). El citoesqueleto de actina se muestra en rojo (A-C) y en gris (A'-C'). La expresión de Caspasa-3 se visualiza en verde. Gran parte de las células que sobre-expresan *ald* muere por apoptosis (A) y una pequeña fracción aumenta su tamaño y se redondea (flecha azul en A). Cuando se inhibe la vía de las JNK, mediante la sobre-expresión del inhibidor *puckered*, se incrementa el número de células grandes y redondeadas que se forma por la presencia de elevados niveles de *Ald* (flechas azules en B'). La sobre-expresión de *puckered* por sí sola no afecta a la integridad del epitelio (C,C').

Una de las formas de activar la vía apoptótica es en respuesta a estrés. En este proceso p53 juega un papel importante, integrando las señales de estrés y determinando si se activa o no la ruta de las JNK's. A su vez, de manera independiente a la vía apoptótica, en respuesta a hipoxia o déficit de glucosa, p53 es capaz de inducir muerte vía mitocondrial (Zhao, Ji et al.). Por lo tanto, dado que los niveles de Ald se estabilizan en respuesta a hipoxia y su sobre-expresión induce muerte celular masiva que no se rescata por inhibición de la vía apoptótica, cabía la posibilidad de que p53 estuviera regulando a

Ald y/o viceversa. Cuando se sobre-expresa p53 en la región central del disco de ala mediante la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*, el fenotipo del ala adulta es idéntico al generado por la sobre-expresión de *ald*. Estudiamos si existía un rescate del fenotipo de los discos *sal<sup>EPV</sup>-Gal4>UAS-p53* reduciendo los niveles de expresión de Ald mediante el ARNi de *ald*, y no observamos rescate alguno. De la misma forma, cuando expresamos *sal<sup>EPV</sup>-Gal4>UAS-ald* en combinación con una forma dominante negativa de p53 tampoco obtuvimos un rescate del fenotipo. El hecho de que la inhibición de Ald no rescate el fenotipo de activación de p53 podría indicar que Ald no es esencial para la función de esta proteína o que actúa por encima de esta. Sin embargo, dado que Ald es una quinasa y en las condiciones experimentales utilizadas la expresión del ARNi de *ald* no es suficiente para eliminar completamente a Ald, no podemos descartar que la falta de efecto se deba a que todavía queda suficiente proteína para mediar su función. Por otro lado, considerando que la inhibición de p53 tampoco rescata el fenotipo de activación de Ald, este resultado sugiere que Ald puede actuar por debajo de p53 y/o de forma independiente a este.

Con estos resultados no podemos establecer ninguna relación funcional clara entre *Ald* y p53. Sin embargo, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación hemos encontrado que Ald y p53 forman parte de un mismo complejo (Fig 74). De hecho, se ha descrito que esta interacción esta conservada en humanos (Huang, Chang et al. 2009), por lo que nos parece interesante seguir estudiando la posible relación entre ambas proteínas y el papel de Ald en el control de la inducción de muerte celular.



**Fig74: Ald y p53 interaccionan físicamente**

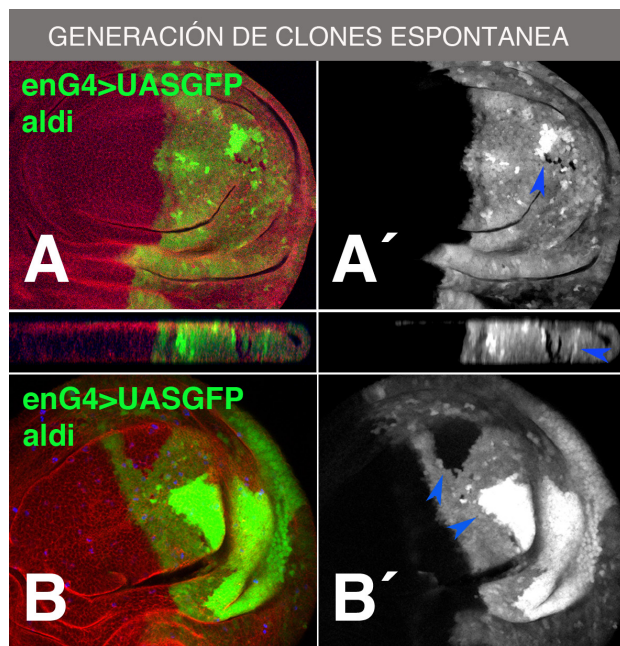
“Western blot” revelado con anti-Ald (banda superior) y anti- p53 (banda inferior). El primer carril muestra la proteína total presente en el lisado de discos en los que se sobre-expresó Ald. El 2º y 3er carril son controles negativos. En el 4º carril se observa presencia de Ald y p53.

## 8.- RECOMBINACIÓN MITÓTICA.

### 8.1.- Inducción de recombinación mitótica en condiciones de falta de función de *ald*.

Analizando el efecto de la reducción de la expresión de *ald* en el epitelio del disco de ala de tercer estadio larvario observamos que los discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* presentaban parches de GFP. Al estudiar detenidamente dichos discos, pudimos comprobar como existían múltiples clones (ausencia de GFP) y clones gemelos (doble GFP) en cada disco (Fig 75). Dada la reducida frecuencia de recombinación mitótica espontánea que existe en células somáticas, esta observación nos pareció realmente interesante. Para estar seguros de que efectivamente se estaban generando clones de recombinación mitótica, llevamos a cabo un estudio genético (ver Materiales y Métodos). Para este ensayo utilizamos un stock que presentaba una mutación para el gen *forked* (*f56*) en el cromosoma X, y que tenía un copia silvestre de este (*f<sup>+</sup>*) insertada en el cromosoma III. Además este cromosoma presentaba una mutación en el marcador cuticular *multiple wing hair* (*mwh*) (Fig 83), que permite detectar en alas adultas si se han generado clones y sus correspondientes clones gemelos.

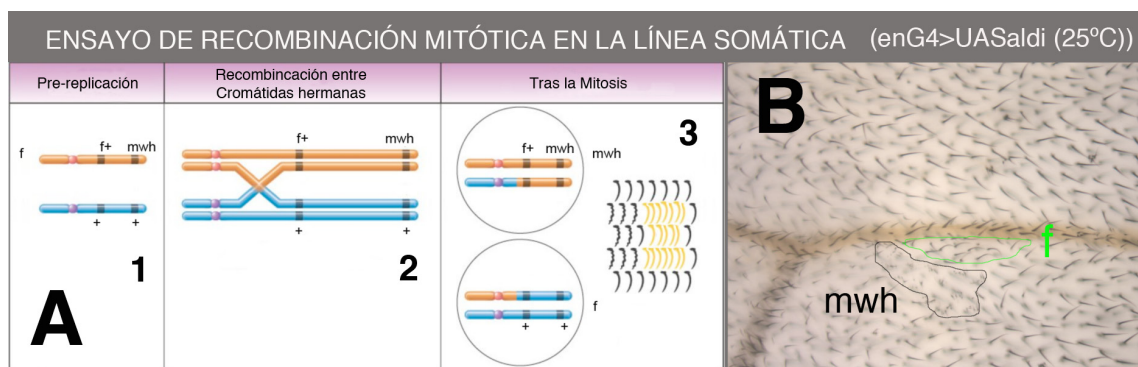




**Fig 75: La falta de función de *ald* induce la formación de clones de manera espontánea en la línea somática.**

(A,B) Plano apical de discos de tercer estadio larvario en los que se han reducido los niveles de Ald en el compartimento posterior (*enGal4>UASGFP/UASald* (25°C)). El epitelio se visualiza en rojo (Faloidina). El dominio de expresión de engrailed está marcado por la expresión de GFP (verde en (A,B) y gris en (A',B')). La reducción de los niveles de Ald induce un incremento de recombinación mitótica, que se manifiesta en la formación de parches de GFP (flechas azules en A' y B').

Por lo tanto, cruzamos hembras *f56; f<sup>+</sup> mwh/TM6* con machos *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/SM5a-TM6b* para analizar la posible existencia de clones en las alas adultas de la descendencia. Este análisis ratificó la formación de clones, presentando una media de 4 clones por ala adulta (Fig 76).



**Fig 76: Ensayo de inducción de Recombinación Mitótica.**

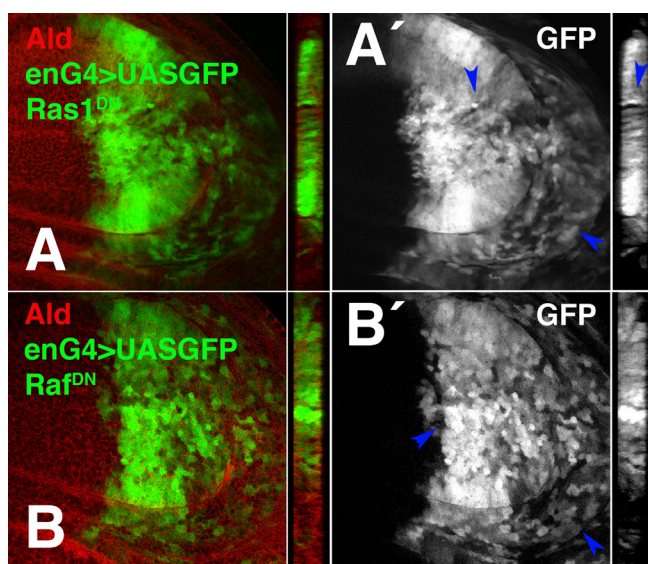
(A) Representación esquemática de los cambios que sufren los cromosomas durante la mitosis. Se ilustra un evento de recombinación mitótica, que da lugar a un reparto desigual de marcadores cuticulares. De esta forma, se puede distinguir en el adulto la formación de clones (B).

Muchos de los clones no presentaban clon gemelo indicando que la recombinación puede ocurrir al azar a lo largo del cromosoma. Así, cuando la recombinación es distal al marcador *forked* los únicos clones que aparecerían estarían marcados con *mwh*, mientras que un doble evento de recombinación (proximal a *f<sup>+</sup>* y entre este marcador y *mwh*) darían lugar a clones sólo marcados con *forked*. Un resultado llamativo es que el tamaño medio de estos clones es muy pequeño  $8 \pm 3$  células por clon. Una posible explicación a este hecho podría ser que la recombinación mitótica tenga lugar cuando los niveles de Ald están por debajo de un umbral, y puede que dicho umbral se alcance de forma tardía en el desarrollo.



### 8.2.- Inducción de recombinación mitótica en condiciones de falta de función de la vía EGFR.

Dado que la inhibición de la vía EGFR daba lugar a una bajada de los niveles de *Ald*, nos planteamos si una reducción de la actividad de esta ruta también incrementaría la frecuencia de recombinación mitótica. Con este fin, expresamos las formas dominantes negativas de Ras1 y de Raf bajo el control de la línea *en-Gal4* en combinación con *UAS-GFP*. Dado que a 25°C la sobreexpresión de estas formas dominantes negativas producen efectos muy drásticos, mantuvimos los cruces a 18°C para tratar de minimizar sus efectos sobre el epitelio. De esta forma, observamos que la inhibición, tanto de Ras1 como de Raf, daba lugar a la generación de parches con mayor intensidad de GFP y parches que perdían la expresión de esta proteína (Fig 77). Por lo tanto, estos resultados muestran que la inhibición de la vía EGFR, al igual que la falta de Ald, incrementa la frecuencia de recombinación mitótica. Con el fin de confirmar esta observación, serán llevados a cabo estudios genéticos para la visualización de los clones en el tejido de ala adulto.



**Fig 77: La inhibición de Ras y Raf induce generación de clones mitóticos de manera espontánea.**

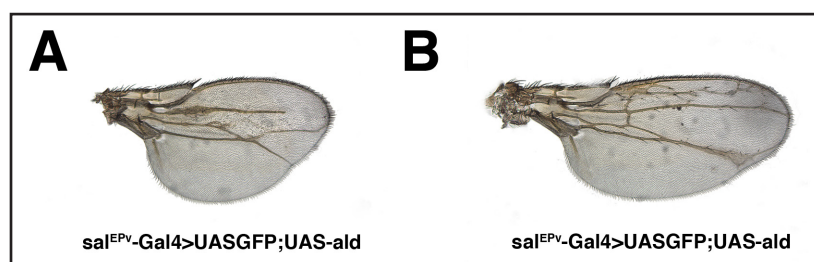
(A) Plano apical de un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario de los genotipos *enGal4>UASGFP;UASRas1DN* (18°C) (B) *enGal4>UASGFP;RafDN* (18°C). En la región lateral derecha se muestran cortes longitudinales en el eje z. El compartimento posterior se encuentra a la derecha y está marcado por la presencia de células GFP positivas (verdes en (A,B) y grises en (A',B')). Ald se ha teñido en rojo (A,B). La inhibición tanto de *ras1* (A,A'), como de *raf* (B,B') da lugar a un incremento de recombinación mitótica, que se manifiesta por la generación de parches GFP (flechas azules).

### 8.3.- Posible mecanismo de acción, *spindle A* (*spn-A*).

El gen *spindle A* (*spn-A*) de *Drosophila* codifica una proteína homóloga a la proteína de eucariotas Rad51 (San Filippo, 2008). Esta proteína está involucrada en mecanismos de reparación de ADN. Cuando se produce una rotura en el ADN, Rad51 promueve su reparación mediante conversión génica (Wei and Rong 2007). De este modo, la secuencia perdida se restaura copiando la secuencia homóloga de la cromátida hermana o del cromosoma homólogo. En el caso de la falta de función de Rad51, la conversión génica se ve gravemente afectada, por lo que otros mecanismos suplen dicha carencia. Dado que el anillamiento de hebras de cadena simple (ADHS) requiere repeticiones en línea para actuar, probablemente se potencie la unión de extremos no homólogos (UENH), dando lugar a un incremento de la susceptibilidad para mutaciones espontáneas (ver apartado de Reparación del ADN en Introducción).

Teniendo en cuenta estos datos y considerando que se había establecido mediante experimentos de doble híbrido que Ald y Spn-A interactuaban físicamente (Stanyon, Liu et al. 2004),

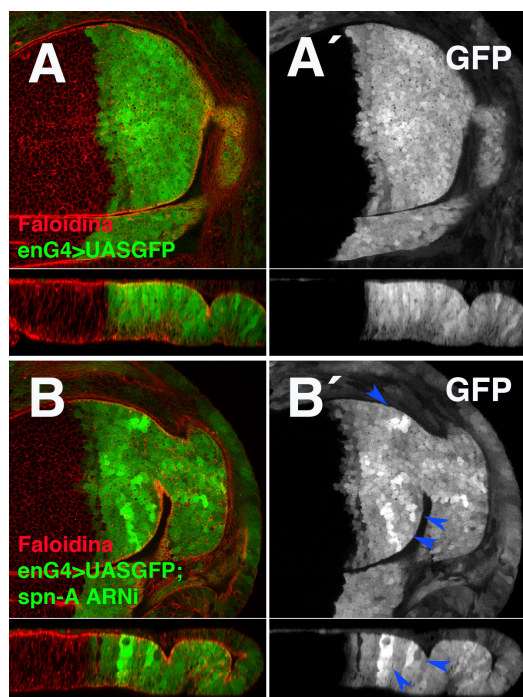
ambas proteínas podrían tener una relación funcional. Apoyando esta hipótesis, en un trabajo publicado por el grupo del Dr McKee se describe como los discos *GMR-Gal4>UAS-sp<sup>n</sup>-A* muestran un incremento muy notable de células en mitosis (Yoo and McKee 2004). Este fenotipo que no es común, puesto que en la búsqueda de genes que pudieran afectar a proliferación que llevamos a cabo en el laboratorio, la sobre-expresión de muy pocas proteínas producía un incremento notable de PH3. A su vez, este trabajo mostraba que la expresión ectópica de *sp<sup>n</sup>-A* también reproducía el efecto de muerte masiva y letalidad observado al sobre-expresar *ald* (Yoo and McKee 2004). Por esta razón, generamos las líneas UAS correspondientes a la isoforma A y B de *sp<sup>n</sup>-A*. Así, comprobamos como al sobre-expresar estas proteínas en el disco de ala mediante la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* se produce un fenotipo similar al de la sobre-expresión de *ald* (Fig. 78).



**Fig 78:** La sobre-expresión de la isoforma B de *sp<sup>n</sup>-A* da lugar a un fenotipo similar al de la sobre-expresión de *ald*.

(A) Ala adulta del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UASald;UASGFP* (B) Ala adulta del genotipo *sal<sup>EPV</sup>Gal4>UAS-sp<sup>n</sup>-A;UASGFP*.

Además, analizamos si en condiciones de falta de función de *sp<sup>n</sup>-A* se generaban clones al igual que habíamos observado con la falta de función de *ald*. Al expresar el ARNi de *sp<sup>n</sup>-A* en el compartimento posterior del disco imaginal de ala pudimos distinguir parches doble GFP y GFP negativos, pudiendo certificar que, en efecto, la falta de función de *sp<sup>n</sup>-A* presenta una función similar a Ald (Fig 79).



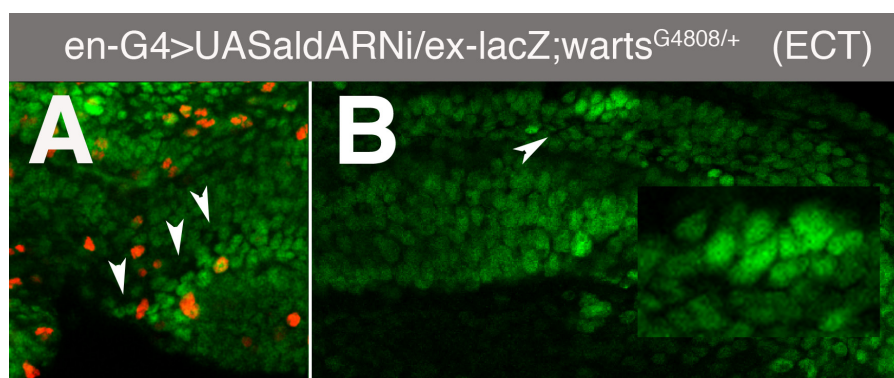
**Fig79.** La inhibición de *sp<sup>n</sup>-A* induce clones de recombinación mitótica de manera espontánea, al igual que *ald*.

Plano apical de discos de tercer estadio larvario del genotipo *enGal4>UASGFP* control (25°C) (A) y *enGal4>UASGFP;UASspn-A RNAi* (25°C) (B). En la región inferior se muestra el corte transversal correspondiente a cada disco. El epitelio está teñido en rojo (Faloidina) y el compartimento posterior por la presencia de células GFP positivas (verde en (A,B) y gris en (A',B')). Los discos control muestran expresión de GFP homogénea, mientras que en los discos en los que se ha expresado el ARNi de *sp<sup>n</sup>-A* se aprecian parches GFP de distinta intensidad (flechas azules en B').

Todos estos resultados preliminares sugieren que la inducción de recombinación mitótica producida por Ald podría estar mediada por Spn-A. Estudios adicionales serán necesarios para establecer los detalles mecánicos de cómo sucede este proceso.

#### 8.4.- Estudio de la posible implicación del incremento de recombinación mitótica en el desarrollo tumoral.

La generación de clones de forma espontánea y en una proporción elevada en tejidos con baja actividad de Ald, indica que Ald podría ser un factor sensibilizador para la pérdida de heterocigósidad. En un fondo genético heterocigótico recesivo para un gen supresor de tumores, la recombinación mitótica espontánea podría dar lugar a la formación de células homocigóticas para esta mutación, y por consiguiente, la formación de un clon de células potencialmente tumorales. Para analizar si en un fondo deficitario para Ald se generaban este tipo de clones, combinamos la falta de función de *ald* con una mutación para el gen *warts* (*mts*). Warts es un regulador negativo de la vía de Hippo, ya que inhibe la entrada al núcleo del factor de transcripción Yorkie (Yki) y de esa forma la activación de sus genes diana (Huang, Wu et al. 2005). La vía de Hippo es una de las principales rutas de señalización reguladoras de la proliferación y su desregulación produce sobrecrecimientos. Para ver si esto ocurría, cruzamos moscas *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>* (25°C) con moscas *warts<sup>G4808</sup>/TM6B*, parte de la descendencia presentó alas con compartimentos posteriores sutilmente más grandes, con ondulaciones en el borde, pero no se observó ningún tumor. Teniendo en cuenta este resultado, pensamos que el hecho de que la generación de los clones sea tardía y dado su reducido tamaño, detectar la formación de sobre-crecimientos en alas adultas sería difícil. Por esta razón, analizamos si se generaban clones que presentaran diferencias proliferativas en el disco imaginal de ala. Para llevar a cabo este análisis, expresamos el ARNi de *ald* en el compartimento posterior del disco imaginal de ala en un fondo *expanded-LacZ (ex-LacZ); warts<sup>G4808/+</sup>*. De esta forma, podíamos seguir la inducción de clones gracias a la pérdida o ganancia de expresión de *ex-LacZ*, (que es un reportero de actividad de Yorkie) y así no interferíamos con la eficiencia del ARNi.



**Fig 80: Estudio del potencial oncogénico de la falta de función de *ald*.**

(A,B) Detalle a mucho aumento de clones generados espontáneamente en discos del genotipo *enGal4>UASald<sup>ARNi</sup>/exlacZ;warts<sup>-/+</sup>*. La generación de clones se sigue por la ganancia o pérdida de la expresión de *exlacZ* (verde). Las células en división se muestran en rojo (PH3 positivas). (A) Clones recién formados (B) Clon *warts<sup>-/-</sup>* o *exlacZ<sup>+/+</sup>* (doble GFP) y su clon gemelo *warts<sup>+/+</sup>* o *exlacZ<sup>-/-</sup>*. (*ex-lacZ* es un alelo hipomorfo para el gen).

Así, al analizar discos *en-Gal4>UAS-ald<sup>ARNi</sup>/exLac-Z; warts<sup>+/+</sup>*, observamos la formación de distintos tipos de clones. Al igual que habíamos descrito en discos *en-Gal4>UAS-GFP/UAS-ald<sup>ARNi</sup>*, la mayor parte de los clones están formados por una o dos células y su clon gemelo, indicando que se acaban de formar, puesto que no reflejan diferencias de tamaño significativas (Fig 80 A). Aunque, también observamos clones mutantes de mayor tamaño que sus clones gemelos (Fig 80B), poniendo de manifiesto que se han generado, bien por la pérdida de heterocigosis de *warts*, o de *ex-lac-Z*. La inserción *ex-lac-Z* es un alelo hipomorfo, y dado que es un regulador negativo de la vía de hippo (Hamaratoglu, Willecke et al. 2006), los clones que presenten dos copias *ex-lac-Z* crecerán más que su clon gemelo, que estará marcado por la ausencia de *lac-Z*. Por otro lado, los clones *warts<sup>G4808/G4808</sup>* también estarán marcados por la expresión del *lac-Z*, ya que también regula negativamente la vía de hippo. De esta forma, hemos confirmado que la pérdida de heterocigosis que tiene lugar en condiciones de falta de función de *ald*, dependiendo del contexto genético, podría llegar a inducir la formación de tumores.





## V. DISCUSIÓN

---



## 1.-ANÁLISIS DE LA BÚSQUEDA DE GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR.

En este trabajo hemos realizado una búsqueda dirigida a identificar genes cuyos fenotipos de sobre-expresión estén produciendo cambios en el patrón de proliferación y/o diferenciación celular durante el desarrollo del ojo. Muchos de los genes que fueron seleccionados en base a su fenotipo de ojo adulto, finalmente han sido descartados por no presentar un fenotipo relacionado con los procesos objeto de estudio. Este hecho revela la importancia de la segunda fase del screening, enfocada a la búsqueda de aquellos genes que realmente estuvieran afectando a la proliferación y/o a la diferenciación neuronal. En ese sentido, el hecho de que hayamos identificado genes como: *e2f*, *rbo*, *sos*, *hb*, *cdt1*, *bancal*, *raps*, *pins*, *charlatan*, *zfh2*...etc, que tienen una función caracterizada como reguladores de estos procesos, refuerza la validez de nuestro abordaje. Por lo tanto, es bastante probable que un análisis más exhaustivo de estos candidatos nos permita encontrar genes cuya función este relacionada con la regulación de los procesos objeto de estudio. Además, considerando que la búsqueda se ha realizado en el disco de ojo y en concreto durante la segunda división mitótica, que es el momento de transición entre el proceso de división y diferenciación, esperamos que algunos de los genes identificados esté involucrado en la regulación de la salida del ciclo celular al final del desarrollo.

Uno de los problemas de la búsqueda de genes por sus fenotipos de sobre-expresión es que estos podrían deberse a un efecto inespecífico, debido a que los niveles de proteína que se inducen



están muy por encima de los fisiológicos. Por lo que cabe la posibilidad de que se den interacciones inespecíficas que no tendrían lugar si la proteína estuviera en las cantidades normales. Sin embargo, nuestros resultados, junto con estudios realizados en el laboratorio del Dr. Jose Felix de Celis, ponen de manifiesto que la sobre-expresión de un gran número de genes no genera fenotipos evidentes. Este hecho sugiere que los efectos inespecíficos no son tan habituales como cabría pensar. Así mismo, otro efecto anómalo que podría producirse en condiciones de sobre-expresión es que el exceso de proteína generada diera lugar a un efecto dominante negativo, inhibiendo la función de la proteína normal. En este caso, se pueden comparar los efectos de la falta y la ganancia de función para tratar de determinar cual es la función real de estos genes. Sin embargo, teniendo en cuenta que multitud de enfermedades, así como defectos de desarrollo, están relacionados con el incremento de los niveles de distintas proteínas, independientemente de si este da lugar a una pérdida o ganancia de función de las mismas, todos los resultados obtenidos serán potencialmente interesantes para su estudio.

## 2.- EL GEN *CG7643* ES EL RESPONSABLE DEL FENOTIPO DE SOBRE-EXPRESIÓN DE LA LÍNEA *EP-M50.2*:

En esta tesis, nos hemos centrado en el estudio de la función del gen responsable del fenotipo de sobre-expresión de la línea *EP-M50.2*. Esta línea fue seleccionada por el interés de su fenotipo de letalidad en la primera fase de búsqueda, junto a la marcada alteración que presentaba el patrón de proliferación y diferenciación en la segunda fase.

El uso de técnicas de ARN interferente nos permitió distinguir que el gen responsable del fenotipo de sobre-expresión de la línea *EP-M50.2* era el *CG-7643*, que codificaba para la serina/treonina quinasa *altered disjunction (ald)*. Hecho que se corroboró al observar que la línea *UAS-ald* transgénica que generamos en el laboratorio fenocopiaba el efecto de la sobre-expresión del *EP-M50.2*

## 3.- ANTECEDENTES DEL *CG-7643* Y SU EFECTO SOBRE PROLIFERACIÓN.

En el momento en el que se inició este trabajo, había sido propuesto que esta quinasa se activaba en respuesta a hipoxia (Fischer, Heeger et al. 2004), mediante la estabilización de los niveles de la proteína, y que su principal función era la de regulador de la maquinaria de “checkpoint” o punto de control del ciclo celular (Gilliland, Wayson et al. 2005). Tanto *ald*, como su ortólogo en humanos (*hmps1*) se activan en respuesta a fallos de unión de los cromosomas al huso acromático, impidiendo que el ciclo progrese hacia anafase (Huang, Chang et al. 2009). Este tipo de proteínas forma parte del mecanismo de control que regula la transición G2/M (Fischer, Heeger et al. 2004). Por esta razón, en un primer momento pensamos que el marcado incremento de PH3 observado en los discos *GMR-Gal4>UAS-ald* era debido a la detención de las células en la fase M del ciclo. Para estudiar esta posibilidad, y descartar un posible efecto sobre el estado proliferativo de las células independiente del ya descrito, analizamos el patrón de marcadores de la fase S, de manera

conjunta con el patrón de PH3. De esta forma observamos que el incremento de células PH3 positivas observado al sobre-expresar *ald* obedece a dos causas. Por un lado, un mayor número de células entra en división, y por otro, las células se detienen de manera transitoria en la fase M del ciclo. El hecho de que un mayor número de células entre en división, se pone de manifiesto por el incremento del marcaje de los distintos marcadores de la fase S del ciclo analizados (EdU, PCNA-GFP, CycE). Así mismo, el hecho de que se observen células en fase S, en la misma región donde se acumulan las células PH3 positivas y en regiones posteriores a la misma, indica que estas células no están detenidas permanentemente en la fase M del ciclo (ver Fig. 33 y 34). A pesar del gran número de células que entra en división en estas condiciones, estas células no muestran marcadores neuronales. De manera que, parece que el exceso de Ald sólo es capaz de forzar a dividirse a aquellas células que no han comenzado el proceso de diferenciación.

Considerando los datos bibliográficos (Fischer, Heeger et al. 2004), una posible explicación de cómo Ald podía promover la entrada de células en mitosis, era que los niveles de CycA y CycB se incrementaran como consecuencia de la alteración de la actividad de Ald. Sin embargo, descartamos esa posibilidad, ya que la co-expresión de estas dos proteínas no reproducía los efectos causados al sobre-expresar *ald*. Así mismo, teniendo en cuenta este resultado y el análisis del fenotipo de sobre-expresión de otros reguladores del ciclo como E2F, CycE, CycD...etc, resultó evidente que el efecto del incremento de los niveles de Ald era debido a un mecanismo más complejo que la mera sobre-expresión de proteínas reguladoras de ciclo. A su vez, dado que tanto la falta como la ganancia de función de *ald*, daban lugar a una pérdida de adhesión celular y de polaridad apico-basal, y este hecho ha sido relacionado con la desregulación de la proliferación, decidimos centrarnos en el estudio de estos fenómenos, ya que el efecto sobre el control de la división celular podía deberse a un efecto indirecto.

#### 4.- EFECTO DE LA DESREGULACIÓN DE *ALD* SOBRE INTEGRIDAD EPITELIAL

En el apartado de resultados se ha descrito minuciosamente el efecto tanto de la ganancia como de la falta de función de *ald* sobre la integridad del epitelio. Este estudio nos ha permitido observar como en condiciones de falta de función de *ald*, los niveles y la distribución de los principales componentes de las UA's (De-cad y Arm) se ven alterados. En el caso de los marcadores de polaridad apico-basal Da-PKC y Dlg, se observa el mismo efecto aunque mucho más débil, estando normalmente más afectada la expresión de Da-PKC. Cabe destacar, que el requerimiento de Ald para mantener la estructura epitelial parece ser general, ya que hemos encontrado fenotipos muy similares tanto en el disco de ojo-antena, como en el disco de ala. Así mismo, también llama la atención el hecho de que estos defectos son más evidentes en las regiones del epitelio que sufren una reorganización espacial más radical, como es el caso de la región posterior al surco morfogénico o la retina de pupa. Este efecto, también ha sido descrito para mutantes de DE-cadherina durante la formación del neuroepitelio embrionario (Almeida and Bray 2005). Durante este proceso, se puede distinguir claramente como la integridad de las uniones adherentes, así como la polaridad apico-basal, se mantienen intactas en la región dorsal (región donde las células no se movilizan), mientras que en la región ventral (zona de delaminación de los precursores neuronales) ambas se pierden por completo. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que los efectos debidos a la falta de

función de *ald*, deben ser originados en primer lugar por un defecto de adhesión, ya que son los componentes de las UAs los más afectados en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. De esta forma, la inestabilidad de estas estructuras, podría afectar de manera indirecta a la definición de los dominios de polaridad. Sin embargo, dado que algunos mutantes para proteínas de polaridad no muestren defectos en la integridad del epitelio salvo en condiciones de “estrés mecánico” (morfogénesis de la retina de pupa, (Pellikka, Tanentzapf et al. 2002), no podemos descartar un posible efecto de la falta de función de *ald* sobre polaridad, de manera independiente a la alteración de las UAs.

Por otro lado, el hecho de que algunas condiciones mutantes para *ald* sólo produzcan fenotipos asociados a procesos muy concretos durante el desarrollo, como ocurre en el caso de los clones *aldB4*<sup>-/-</sup> generados en el ojo (sólo presentan fenotipo tras la reorganización que sufre el epitelio durante el estadio de pupa), sugiere que los niveles de Ald deben ser regulados de forma muy precisa y que para algunos procesos, cantidades mínimas de esta proteína son suficientes para realizar su función. Teniendo en cuenta este razonamiento, y dado que los efectos de falta de función de *ald* observados al expresar el ARNi son más fuertes que los de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>, este efecto debe obedecer a diferencias en los niveles de Ald. Estas diferencias podrían explicarse por varias razones. En primer lugar, el efecto materno, ya que hemos visto que al cruzar individuos mutantes homocigóticos, la descendencia muere en estadio embrionario o en L1. El efecto materno puede ser mediado por la presencia de proteína y ARNm que las hembras depositan en el oocito. Por lo que si el ARNm es muy estable, en los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup> este puede traducirse y seguir generando proteína. En cambio, cuando sobre-expresamos el ARNi, la degradación del ARNm se lleva a cabo de manera activa, reduciendo los niveles de esta molécula de forma más eficiente, y por lo tanto, también de la proteína. De esta forma, si al igual que su ortólogo en humanos Ald mediera su estabilización mediante autofosforilación, la reducción de los niveles de proteína de nueva síntesis producida por la expresión del ARNi, eliminaría la proteína remanente de manera más eficiente que en el caso de los mutantes *aldB4*<sup>-/-</sup>. A su vez, hay que tener en cuenta que el alelo *aldB4* codifica para los primeros 48 aminoácidos de la proteína, pudiendo suplir parte de la función de la misma.

En el caso de la sobre-expresión, la pérdida de integridad epitelial es mucho más drástica que en condiciones de falta de función, tanto en el ala como en el ojo. Las células con elevados niveles de Ald en el epitelio del disco imaginal de ala pierden totalmente la expresión de marcadores de adhesión celular. En cambio, los marcadores de polaridad se ven afectados de manera diferencial. En el caso de Da-PKC, normalmente desaparece de la membrana. Sin embargo, Dlg pierde su localización restringida a la región baso-lateral, distribuyéndose por toda la membrana. Estas células pierden las características epiteliales, se dividen activamente y se movilizan por el epitelio, llegando a degradar la lámina basal. En su conjunto, estos datos implican que estas células han sufrido una transición epitelio-mesénquima. En el epitelio de la región posterior al surco morfogénico, parece que la sobre-expresión tiene el mismo efecto. Además, aunque no hemos analizado si la lámina basal está afectada, se puede ver como los fotorreceptores migran e invaden el lóbulo óptico, y recientemente hemos observado que estos fotorreceptores pierden marcadores de diferenciación (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta que algunos de los fenotipos causados por la sobre-expresión de *ald* son similares a los generados por la falta de función del gen, cabe la posibilidad de que algunos de los efectos que vemos al sobre-expresar *ald* fueran debidos a un efecto dominante negativo. Este efecto ha sido observado con otras quinasas, como es el caso de Raf, cuya sobre-expresión da lugar a un

fenotipo de falta de función de la vía en la que actúa. En el caso de *ald*, parece que la sobre-expresión se corresponde con una ganancia de función de la proteína. Por un lado, al sobre-expresarlo en el ojo se observa el retraso en la salida de la Fase M descrito en condiciones de activación de sus ortólogos. Así mismo, en condiciones de falta de función no hemos observado movilidad celular ni invasión, a diferencia de lo que ocurre con la sobre-expresión. Sin embargo, a pesar de estas evidencias no podemos descartar del todo que parte de los fenotipos que observamos sean debidos a un efecto dominante negativo. Alternativamente, como ocurre con otras proteínas necesarias para el mantenimiento de la integridad epitelial, es posible que su función tenga que ser regulada de manera muy precisa, por lo que un exceso o un defecto de actividad pueda afectar al equilibrio molecular que mantiene la estabilidad del epitelio. De manera que, a pesar de que el efecto de la ganancia o de la falta de función sea distinto, el resultado final puede ser el mismo, como ocurre con la regulación de Moesina que hemos descrito. De manera complementaria hemos generado una forma quinasa inactiva (Ald<sup>KD</sup>), para sobre-expresarla y ver cuales son las diferencias con el fenotipo de sobre-expresión de *ald*. Además, utilizando la forma (Ald<sup>KD</sup>) pretendemos analizar que funciones de las descritas para *ald* son mediadas por su actividad como quinasa.

## 5.- EFECTORES A TRAVÉS DE LOS CUALES *ALD* EJERCE SU FUNCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA INTEGRIDAD EPITELIAL

Nuestros resultados indican que *ald* regula el mantenimiento de la integridad epitelial. Así mismo, el efecto pleiotrópico de su desregulación sugiere que *ald* debe estar actuando a través de múltiples efectores.

### 5.1.- Moe y Rho como efectores de la función de *ald*.

Ald muestra una clara relación funcional con Moe y Rho1. Así, encontramos que tanto en condiciones de falta como de ganancia de función de *ald*, la actividad de Moesina se ve afectada de manera drástica. La expresión del ARNi de *ald* en el ala reduce la fosforilación de Moesina, inhibiendo su función, hecho que concuerda con la interacción sinérgica observada al combinar el ARNi de *ald* y *moe*. Además, la sobre-expresión de Moesina rescata parcialmente el fenotipo de la falta de función de *ald*. Todo esto sugiere que parte de los defectos causados por Ald son debidos a la desregulación de Moe.

Un resultado aparentemente contradictorio es el hecho de que la sobre-expresión de *ald* incrementa los niveles de Moesina y P-Moe (forma activa de la proteína) en las mismas células que presentan una elevada actividad de Rho1. ¿cómo puede Ald dar lugar a este efecto?. Una posibilidad es que Ald regule la actividad de Rho1 de manera directa, e independiente de Moesina. Dado que se ha descrito que Rho es capaz de regular la localización de Moesina mediante fosforilación, y que existe una relación de antagonismo funcional entre ambas proteínas (Speck, Hughes et al. 2003), Rho1 podría impedir la localización de Moesina en la membrana (Shaw, Henry et al. 1998). Esta posibilidad explicaría el hecho de que la sobre-expresión de *ald* impide la presencia de Moe en la membrana celular. A su vez, la sobre-expresión de *ald*, tal y como hemos comentado con anterioridad, podría dar lugar a un efecto dominante negativo, reduciendo los niveles y la actividad de Moesina.



Por otro lado, tanto la activación de Rho1, como la inhibición de Moesina han sido relacionadas con la inducción de una transición epitelio mesénquima y la adquisición de capacidad invasiva (Speck, Hughes et al. 2003). En condiciones de sobre-expresión de *ald*, las células pierden las características epiteliales, degradan la lámina basal e invaden los territorios adyacentes. En estas células, tal y como hemos mostrado, Rho1 está activo y Moesina inactiva. Por lo que la desregulación de la función de estas proteínas parece mediar, al menos en parte, los efectos ocasionados por cambios en los niveles de Ald. Aunque, el hecho de que la eliminación de estas proteínas no de lugar a un rescate total de los fenotipos producidos por la sobre-expresión de *ald*, indica que no son los únicos efectores de Ald y que esta quinasa debe de estar funcionando sobre más efectores.

En su conjunto, nuestros resultados apoyan un modelo en el que la función de Ald es requerida para regular los niveles y la actividad de Moesina. Así mismo, ya sea a través del efecto sobre Moesina o de forma directa, Ald también regula la actividad de Rho1.

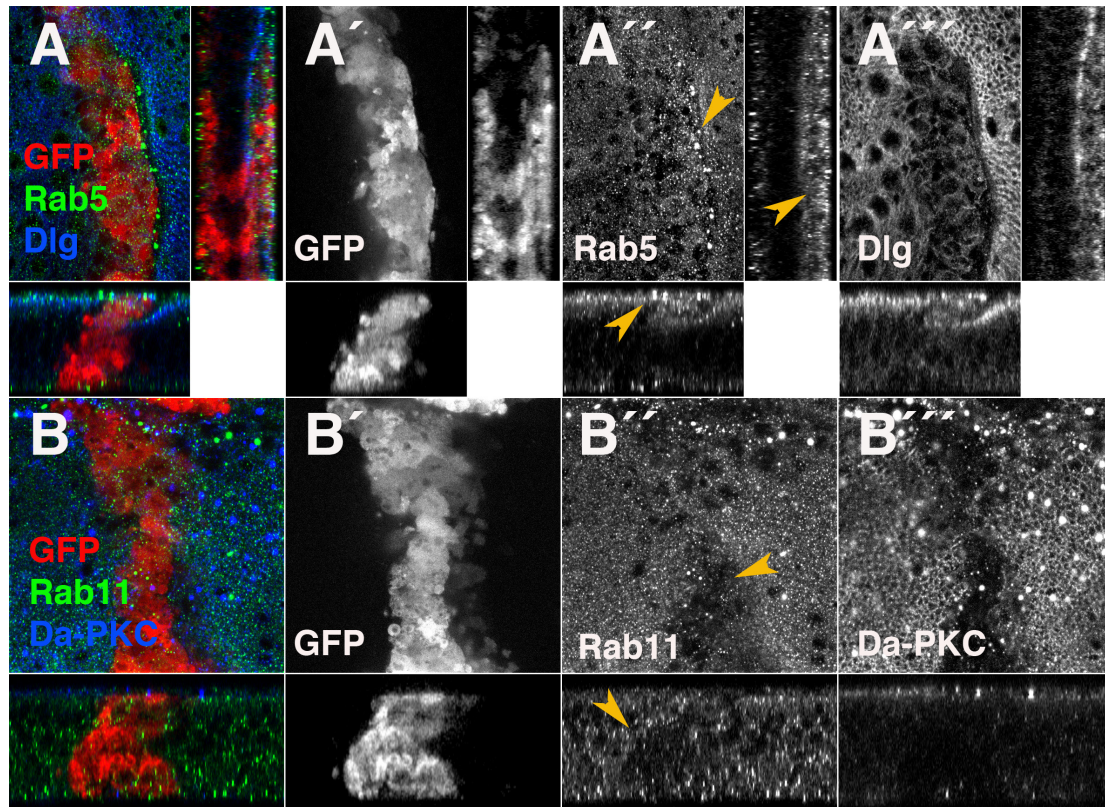
## 5.2.- Relación entre Ald y LKB1.

Una de las rutas que parece estar funcionalmente relacionada con Ald es la ruta de LKB1. La falta de función de ambas proteínas da lugar a fenotipos de pérdida de integridad epitelial, observándose una potenciación del fenotipo al combinar la falta de función de ambas proteínas (Amin, Khan et al. 2009). Durante el transcurso de este estudio, no hemos podido establecer si LKB1 regula a Ald y/o viceversa, aunque hemos encontrado que Rho1 podría ser un posible efector común de ambas proteínas. Tal y como se ha descrito, Rho1, al igual que Ald y LKB1, modula la tensión apical de las células mediante la regulación de Sqh. A su vez, este efecto, unido a su función como regulador de la endocitosis de DE-cad podría explicar el amplio rango de defectos observados en la retinas mutantes para *ald* y *lkb1* (ausencia, elongación, desestructuración y localización ectópica de las UA's), ya que afecta tanto a la llegada como a la estabilización y/o reciclaje de DE-cad.

## 5.3 Otros posible efectores de la función de *ald* en el mantenimiento de la integridad epitelial

A parte de Moesina y Rho1, hemos encontrado que la falta de función de *ald* interacciona con otras muchas proteínas. Entre estas, cabe destacar proteínas de polaridad cuya función es esencial para mantener la integridad del epitelio, algunas de las cuales, como Da-PKC o Dlg, presentan defectos en su distribución y una reducción de sus niveles en condiciones tanto de falta como de ganancia de función. Es interesante resaltar que la falta de función de los determinantes del dominio basolateral (Dlg, Igl) potencian de manera notable el fenotipo generado por la reducción de los niveles de Ald, mientras que en el caso de Da-PKC, parece rescatar este fenotipo. Esto podría implicar que *ald* regula de alguna manera la actividad de estas proteínas. Teniendo en cuenta que en condiciones de sobre-expresión de *ald*, Dlg expande su dominio de membrana y Da-PKC se elimina, cabe la posibilidad que Ald regule la localización de Da-PKC en la membrana, eliminando el efecto de inhibición que esta ejerce sobre las proteínas del dominio basolateral, y permitiendo por tanto, que estas se expandan. A su vez, dado que *ald* es una quinasa, y que la restricción de la localización de Da-PKC se media por reacciones de auto-exclusión que implican fosforilación, Ald podría mediar su efecto de manera directa sobre Da-PKC. Por otro lado, teniendo en cuenta que

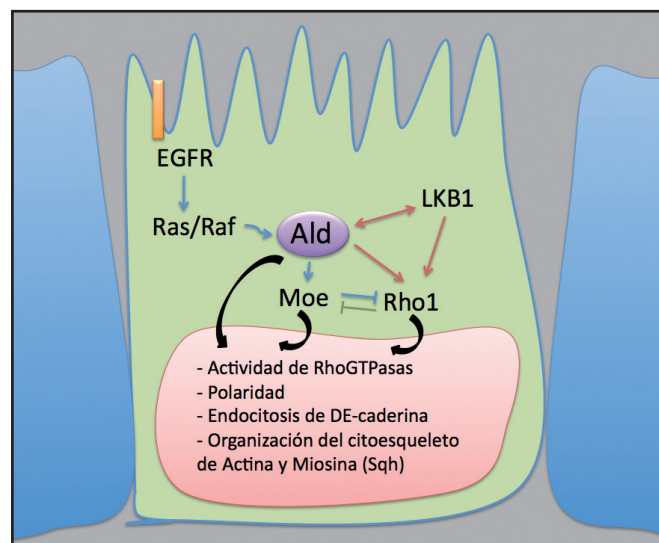
existe una íntima relación entre la regulación del tráfico vesicular y el mantenimiento de la correcta localización de estas proteínas, esta podría ser otra alternativa. De hecho, recientemente hemos observado que en condiciones de ganancia de función de *ald* se observa un marcado incremento en la endocitosis mediada por Rab5 (marcador de endocitosis temprana) y una reducción notable del tráfico a membrana (marcado por la ausencia de Rab11), observándose una marcada reducción de los niveles tanto de Da-PKC como de Dlg. (Fig 1)



**Fig1: La sobre-expresión de *ald* modifica la endocitosis.**

(A,B) Sección apical de la región central del disco imaginal de ala de tercer estadio larvario. A la derecha de cada sección se dispone el corte longitudinal y en la región inferior el corte transversal. (A,B) En rojo se muestra el territorio de sobre-expresión de *ald* (*ptc-Gal4*) marcado por la expresión de la proteína GFP (gris en A',B'). (A) Dlg y (B) Da-PKC están marcados en azul, gris en (A'',B'' y A''',B'''). La figura muestra un incremento de vesículas endocíticas (marcadas por Rab5) (A') y una reducción de la vesículas de reciclaje a membrana (Rab11). La desregulación del transporte de vesículas se corresponde con la alteración de los niveles de Da-PKC y Dlg.

En resumen, nuestros resultados sugieren que *ald*, al igual que ocurre con otros reguladores de la integridad epitelial, ejerce su función en el mantenimiento de la homeostasis tisular a través de diferentes mecanismos. De manera simplificada (Fig 2), la desregulación de Ald, da lugar a cambios en la actividad de Rho1 y Moe, de manera directa o indirecta. Estos cambios, a su vez, alteran la endocitosis de DE-cad, la organización del citoesqueleto y la polaridad apico-basal. Establecer los mecanismos mediante los cuales se regulan estos procesos necesitará estudios más detallados.



**Fig2: Esquema del posible mecanismo de acción de Ald y su conexión con el mantenimiento de la integridad epitelial.**

El color de la flechas refleja el tipo de interacción. Azul (confirmadas), verde (Propuestas y demostradas en otros organismos), Roja (posible).

## 6.- UTILIDAD DEL ENSAYO DE MOVILIDAD

El ensayo de movilidad nos ha permitido ver como las células que sobre-expresan *ald* invaden el tejido silvestre adyacente a estas. Pero además, mediante esta aproximación experimental podemos distinguir los distintos fenotipos asociados a la desregulación de *ald*. Por el momento, hemos encontrado que las células adquieren movilidad mediante tres vías fundamentalmente. Por un lado, la activación de Rho1, ya que la inhibición de esta proteína bloquea completamente este fenotipo. De igual manera ocurre al inhibir la vía de las JNK. Dado que Rho1 es un conocido regulador de la vía de las JNK's, *ald* podría estar activando la vía de manera indirecta a través de esta proteína. Así mismo, la sobre-expresión de DE-cad también impide la dispersión celular, posiblemente mediante el refuerzo de la adhesión celular. Por lo tanto, hay que tener en cuenta que nuestro modelo se asemeja al contexto celular existente en los bordes de los tumores sólidos, donde las células pierden los marcadores de adhesión y empiezan a migrar (Vidal, Salavaggione et al.). Teniendo en cuenta que el ortólogo en humanos (hMps1) está sobre-expresado en multitud de líneas celulares tumorales, y que en base a nuestros resultados parece que existe un alto grado de conservación funcional, este estudio podría aportar datos relevantes acerca del mecanismo molecular a través del cuál Ald media la adquisición de capacidad invasiva, permitiendo establecer posibles dianas terapéuticas.

## 7.- INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR.

La sobre-expresión de *ald* induce muerte celular masiva que da lugar a la activación de la vía de las JNK. La activación de esta vía se produce a través de múltiples señales, una de las cua-

les es la pérdida de integridad epitelial. Ha sido propuesto, que en respuesta a la desintegración del epitelio que conlleva la pérdida de Moesina de la membrana, Rho1 se activa (Neisch, Speck et al.). Tal y como hemos descrito, la sobre-expresión de *ald* evita que Moesina se localice en la membrana y en estas condiciones, la pequeña GTPasa Rho1 se activa e interacciona con una serie de quinasas, que a su vez, activan el complejo Hep-Bsk (JNKK/JNK). De esta forma, Bsk activa a Hid, que inhibe a Diap1, liberando de este modo a las Caspasas para que ejerzan su efecto. En nuestro caso, la sobre-expresión de *ald* da lugar a una clara reducción de los niveles de Diap1. De manera que, esta reducción podría ser debida a la activación de Hid. Considerando nuestros resultados esta hipótesis es pausable, sin embargo, dada la pleiotropía de *ald* no podemos descartar mecanismos alternativos que induzcan muerte. Consistente con esa posibilidad encontramos que la co-expresión de distintos inhibidores de la vía apoptótica no rescataba el efecto de muerte celular inducido por la sobre-expresión de *ald*. Este hecho nos lleva a pensar que dado que *ald* es un gen de respuesta a estrés, su expresión mantenida pueda inducir muerte celular de manera alternativa a la vía de apoptosis. Como se introdujo brevemente en el apartado de resultados, p53 integra las señales de estrés, activando por un lado la vía de las JNK, y por otro, de manera independiente, la vía de muerte mitocondrial (Zhao, Ji et al.). En el caso de la sobre-expresión de *ald*, la co-expresión de *puc* rescató parcialmente la viabilidad celular, indicando que parte del efecto de muerte producido por la sobre-expresión de *ald* era debida a la activación de esta vía. Sin embargo, dado que el rescate no era completo, *ald* debe inducir muerte celular de manera alternativa a la activación de las JNK's. Este resultado apoya la idea de que *ald*, al igual que p53, es capaz de inducir muerte a través de las JNK y de manera independiente a esta ruta. Dada la similitud de efectos de p53 y *ald*, y teniendo en cuenta que se había propuesto que ambas proteínas interactuaban físicamente (ref), nos pareció interesante estudiar si existía una relación funcional entre ambas. Hasta el momento, no hemos encontrado una interacción genética clara entre *ald* y p53. Aunque, hay que tener en cuenta que el análisis de las interacciones genéticas se llevó a cabo atendiendo al fenotipo de ala adulta, y tal como hemos explicado en el caso de la inhibición de la vía de las JNK's, sólo se observa rescate en el epitelio del disco imaginal. Así, aunque todavía no hemos podido establecer una interacción genética clara, sí hemos comprobado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación "in vivo" que p53 y *ald* interactúan físicamente. Por lo tanto, en base a este resultado, parece plausible que ambas proteínas actúen de manera conjunta. Además, el hecho de que esta interacción se conserve en humanos, sugiere que puede ser un mecanismo general.

## 8.- PAPEL DE *ALD* COMO INHIBIDOR DE RECOMBINACIÓN MITÓTICA, SU RELACIÓN CON LA VÍA DEL EGFR Y POSIBLES MECANISMOS A TRAVÉS DE LOS CUALES *ALD* EJERCE ESTA FUNCIÓN.

### 8.1.- Ald/EGFR y recombinación mitótica

La recombinación mitótica es un evento muy poco frecuente que se produce por fallos en los mecanismos de respuesta y reparación del ADN. Estos defectos normalmente conducen a la pérdida de heterocigosidad, hecho que dependiendo del contexto genético puede entrañar un elevado riesgo para el organismo (LaRocque, Stark et al.). En condiciones de falta de función de *ald*, hemos encontrado que esta frecuencia se ve notablemente incrementada, de manera que se generan múltiples clones en el tejido. Los niveles del ortólogo de *ald* (hMps1/TTK) están desregulados en



multitud de líneas tumorales (Liu, Cheng et al.) y otros estudios han demostrado que el oncogen Raf (BRafV600E) es capaz de regular los niveles y la actividad de hMps1 (Liu, Cheng et al.). Nuestros resultados muestran que esta regulación se mantiene en *Drosophila* y además hemos encontrado que la falta de función de raf y de ras1, también parece inducir recombinación mitótica. A la vista de la regulación de los niveles de *Ald*, mediada por la vía del EGFR, parece que su efecto sobre recombinación mitótica puede ser debido a la reducción de *ald*, aunque todavía no hemos podido estudiar esta posibilidad.

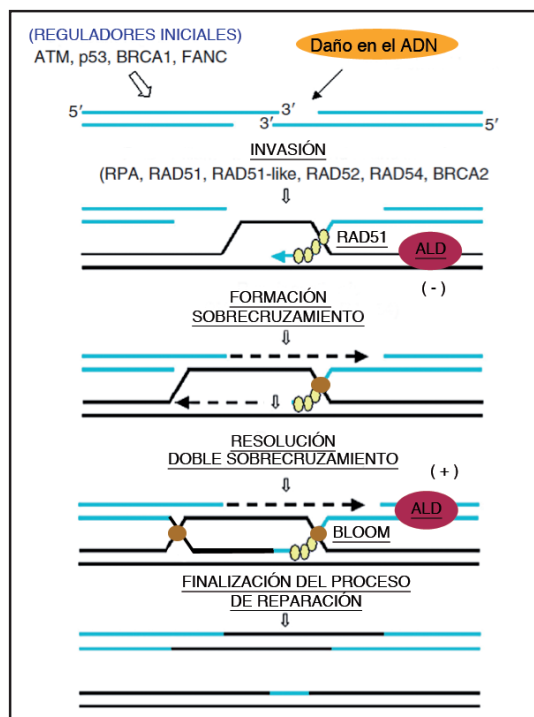
## 8.2.- ¿Cómo puede estar mediando este efecto *ald*?

### 8.2.2.-Reguladores del proceso de recombinación mitótica.

El hecho de que durante la reparación del ADN la recombinación mitótica sea infrecuente en las células somáticas, sugiere que deben existir factores que la regulan y evitan que se produzcan entrecruzamientos indebidos. Dado el efecto que observamos en condiciones de falta de función de *ald*, esta quinasa podría estar regulando varios factores. Un candidato a mediar los efectos de *ald* es la helicasa RecQ o DmBlm, cuya falta de función da lugar al síndrome de Bloom (BLM). La falta de función de esta helicasa incrementa en gran medida el entrecruzamiento espontáneo entre cromátidas de cromosomas homólogos, los intercambios entre cromátidas hermanas y la pérdida de heterocigosidad espontánea (LaRocque, Stark et al.). DmBlm inhibe el intercambio de cromátidas al disolver el segundo sobrecruzamiento que se forma durante la RH (ver introducción, Fig 14). Ha sido descrito que en humanos, hMps1 media la fosforilación de Bloom (Leng, Chan et al. 2006), regulando su actividad y promoviendo inestabilidad cromosómica, de manera, que establecen un nexo entre los mecanismos de control de la mitosis y la inestabilidad cromosómica. Teniendo en cuenta que nuestros resultados con *ald*, al igual que otros llevados a cabo en ratones con *blm*, dan lugar a un incremento de recombinación mitótica, es muy probable que DmBlm puede estar mediando el efecto observado en mutantes para *ald*.

Otro candidato interesante a estar mediando los efectos de Ald en los mecanismo de reparación del ADN es el gen *spindle A* (*spnA*). Este gen codifica para el ortólogo en *Drosophila* de la proteína de eucariotas Rad51 (Yoo and McKee 2004). Esta proteína está involucrada en mecanismos de reparación del ADN y en condiciones de falta de función de Rad51, se observa un incremento de la susceptibilidad para mutaciones espontáneas (Wei and Rong 2007). Rad51, actúa promoviendo la recombinación homóloga, mediando el intercambio de las cromátidas mediante interacción directa. Ha sido propuesto que Ald y Rad 51 interactúan físicamente (<http://www.droidb.org/>). Por lo que Ald podría ser requerido para promover la actividad de Rad51. La función de este factor parece ser importante en la regulación de los mecanismos de reparación del ADN, ya que se ha descrito que interactúa con Blm y las helicasas BRCA1 y BRCA2. La falta de función de estas helicasas dan lugar a inestabilidad cromosómica y pérdida de heterocigosidad, y han sido relacionadas con una elevada predisposición a padecer cáncer de mama.

Por lo tanto, la función de Ald actuando a través de Rad 51, o directamente sobre DmBlm, podría ser requerida para deshacer las estructuras cromosómicas que se forman durante los procesos de reparación del ADN, y que pueden dar lugar a recombinación e intercambio de cromátidas. De manera, que una insuficiencia de *ald* daría lugar a que durante la división de las células somáticas se incrementara la frecuencia de intercambio de cromátidas con la consiguiente pérdida de heterocigosidad (Fig 3).



**Fig3: Representación esquemática del posible mecanismo de acción de Ald para regular la recombinación homóloga.**

Los símbolos (-) y (+) se corresponden con un posible efecto de inhibición y activación respectivamente.

### 8.2.3.- *LKB1*.

La falta de función de todos estos genes da lugar a síndromes autosómicos recesivos que predisponen a la formación de tumores en edades tempranas y que malignizan en un elevado porcentaje. Además, estos síndromes suelen estar asociados a la pérdida de heterocigiosidad y a la adquisición de mutaciones secundarias, además de un efecto de inestabilidad cromosómica. Uno de estos síndromes, es el denominado síndrome de Peutz-Jehgers (SPJ) (Alessi, Sakamoto et al. 2006). Este síndrome se caracteriza por una predisposición por parte de individuos heterocigóticos a desarrollar pólipos intestinales y múltiples tumores benignos. Los pacientes con este síndrome tienen un elevado riesgo de que dichos tumores se vuelvan malignos, afectando fundamentalmente a tejidos con una elevada tasa proliferativa. Esta enfermedad ha sido asociada a la falta de función de *LKB1* (Alessi, Sakamoto et al. 2006). La mayor parte de los tumores adquieren varias mutaciones somáticas en el alelo silvestre de *LKB1*, estableciendo que *LKB1* es un gen que induce susceptibilidad mutagénica. Por otro lado, el análisis de los tumores generados establece que un alto porcentaje de los mismos ha perdido totalmente la función de *LKB1*, debido a una pérdida de heterocigiosidad. Estos datos cuadran con una posible función de *LKB1* en la represión de los mecanismos que regulan la recombinación homóloga. Por lo tanto, en base a la similitud de fenotipos existente entre *ald* y *LKB1*, y dado que parte de los pacientes que padecen el síndrome de PJS no presentan mutado *LKB1*, sería interesante establecer si la relación existente entre *ald* y *LKB1*, también está relacionada con el mantenimiento de la estabilidad cromosómica.

## 9.- PAPEL DE *ALD* EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.

Nuestros datos indican que la desregulación de los niveles de *Ald* puede contribuir a la formación y progresión de tumores mediante diferentes mecanismos.

Por un lado, la sobre-expresión de *ald* induce una pérdida de integridad epitelial muy marcada, acompañada por la formación de células que han sufrido una transición epitelio mesénquima. Normalmente, la formación de este tipo de células es determinante para la progresión tumoral, ya que las células que se encuentran en los bordes del tumor, son las que sufren esta transición, dando lugar a metástasis (Giannoni, Parri et al. ; Thiery 2002). En nuestro caso, hemos observado como estas células son capaces de invadir territorios adyacentes, aunque finalmente la mayor parte termina siendo eliminada por muerte celular. En este caso, la combinación con los oncogenes Ras<sup>V12</sup> y N<sup>intra</sup> es capaz de incrementar de manera notable la viabilidad de estas células, potenciando el efecto de la sobre-expresión de *ald*.

Por otra lado, en condiciones de falta de función de *ald*, la integridad epitelial también se encuentra afectada, por lo que estos cambios pueden sensibilizar al epitelio y hacer que sea más susceptible a segundas mutaciones. El hecho de que diferentes mutaciones cooperen en la formación de tumores es algo muy habitual en humanos (Dow, Elsum et al. 2008). Así mismo, en *Drosophila* existen varios modelos basados en el efecto conjunto de varias mutaciones para promover metástasis (Pagliarini and Xu 2003; Wu, Pastor-Pareja et al. 2010). En nuestro caso, hemos observado como la reducción conjunta de *ald* y del gen supresor de tumores *lgl* tiene un efecto sinérgico, potenciando el efecto que cada uno tiene por sí sólo sobre la integridad del epitelio. Pero, en condiciones normales esto no es suficiente para que se genere un tumor. En cambio, cuando a esta condición genética se le suma el efecto del estrés nutricional, las células pierden el control y crecen de manera descontrolada. Este efecto se ha observado en otras condiciones mutantes, como es el caso de LKB1 o Pins. La falta de función de *lkb1* tiene efectos sutiles en el epitelio de la cámara del huevo de *Drosophila*, pero en condiciones de estrés metabólico las células pierden completamente la polaridad y sobrecrecen (Mirouse, Swick et al. 2007). Así mismo, la desregulación de Pins en los neuroblastos del SNC de *Drosophila*, también da lugar a sobrecrecimientos en condiciones nutricionales deficitarias (Rossi, 2012).

Finalmente, tal y como hemos sugerido con anterioridad, el efecto de inducción de recombinación mitótica al que da lugar la falta de función de *ald* es otra forma de sensibilizar el tejido para el desarrollo de tumores. De esta forma, cuando se reducen los niveles de Ald en un fondo mutante heterocigótico para un gen supresor de tumores (*warts*), se generan clones que pueden sobre-crecer. Estudios realizados con el ortólogo de *blm* de ratón, han confirmado que la falta de función de proteínas reguladoras de la recombinación homóloga dan lugar a la formación de tumores “in vivo” (Henning, 2003), estableciendo un nexo entre la regulación de estos procesos y los distintos síndromes asociados a la falta de función de estas proteínas en humanos. Por lo tanto, dada el alto grado de conservación existente entre estos mecanismos, puede que el efecto observado en condiciones de falta de función de *ald*, también este conservado.

Por lo tanto, parece que la desregulación de la actividad de *ald* es un factor relevante de cara a la formación y progresión tumoral. Así mismo, los resultados obtenidos, apoyan la idea del origen multifactorial de los tumores. De esta forma, con el estudio realizado en esta tesis, esperamos haber contribuido al conocimiento de la función de esta quinasas. Además teniendo en cuenta la conservación funcional que parece mostrar *ald* con hMps1, esperamos poder extrapolar alguno nuestros datos a organismos superiores.







## VI. CONCLUSIONES

---



- 1) The *EPM50.2* line over-expression phenotypes are due to *altered disjunction (ald)* gene expression
- 2) The gain or loss of *ald* function is directly or indirectly associated with the induction of cell proliferation.
- 3) *Ald* loss of function induces epithelial integrity loss, distinguished by deficiencies in the levels and localization of the DE-cad and Arm adhesion markers and the Da-PKC and Dlg apico-basal polarity markers.
- 4) During development, *ald* levels requirement to maintain the epithelial integrity vary depending on the morphogenetic context.
- 5) *Ald* regulates, either direct or indirectly, Moesin phosphorylation and localization as well as Rho1 activity. This effect on Moesin/Rho1, causes some of the epithelial integrity phenotypes observed in both, *ald* loss and gain of function conditions.
- 6) Loss of *ald* function, like the EGFR pathway, induces mitotic recombination, resulting in a loss of heterozygosity effect sensitizing tissue to tumor development.
- 7) Overexpression of *ald* induces cell death, at least partially, through the activation of the JNK's pathway.
- 8) Overexpression of *ald* induces epithelial-mesenchymal transition, in which cells acquire mobility and invasiveness. *Ald* regulates part of this effect through Rho1 and JNK activation and DE-cad levels reduction.
- 9) Levels of *ald* deregulation cooperates with various genetic and nutritional conditions in the development and progression of tumors.
- 10) EGFR pathway regulates *ald* activity, through the modulation of protein levels.





## VII. RESUMEN

---



Mps1 (Mono-polar spindle 1) is an evolutionary conserved serine treonine kinase that regulates normal mitotic progression and the spindle checkpoint in response to stress. Changes in Mps1 protein levels have been related with the development of cancer in human. This tumor-promoting function it's been attributed to the chromosomal instability observed when the activity of this kinase is modified. However, other functions of this kinase involved in tumor progression still remain unknown. We have analyzed the function of the *Drosophila melanogaster* Mps1 homologue, *altered disjunction (ald)*.

Our data indicate that ald activity alteration can contribute to the tumour formation and progression by different mechanisms.

Firstly, *ald* deregulation in different imaginal discs causes alteration of the components of the adherents junctions and the disruption of the apico-basal polarity domains, compromising the epithelial integrity. Indicating that the function of *ald* is required for the definition and/or maintenance of the epithelial tissue architecture. The lack of epithelial integrity induced by both, gain and loss of function of *ald*, caused changes in the properties of the mutant epithelial cells. Thus, cells that over-express Ald undergo a pseudo epithelial to mesenchymal transition (EMT) and acquire cell motility and invasiveness properties. We have found that Ald mediates part of these effects by regulating Moesin, Rho1 and the JNK signalling. Furthermore, this effect it is enhanced by the combination with Ras<sup>V12</sup> and Notch<sup>intra</sup> oncogenes. Moreover, our observation indicate that ald mutant epithelium is sensitive to changes in the levels of other tumour suppressor genes, such as *lethal giant larvae (lgl)*, as indicate that double mutant *ald/lgl* epithelium massively overgrowth when the larvae are raised at restrictive metabolic condition.

Secondly, we have identified a new role for this kinase, preventing mitotic recombination in the somatic cells. Mitotic recombination is a rare event caused by failure in DNA damage response and repair mechanisms. This incident can produce loss of heterozygosity (LOH), a process that can be very deleterious for the organism and increased susceptibility to the development of tumour. In *ald* mutant flies we observed that the frequency of mitotic recombination was strongly increased. As consequence of this defect we have found that flies heterozygous for mutations on tumor suppressor genes, frequently develop clones of mutant cells for these genes that can overgrowth. Indicating the high susceptibility of these flies to develop tumors.

In summary, our work uncovered novel functions for this kinase that could help to understand its contribution to the biogenesis and tumor progression.





## VIII. BIBLIOGRAFÍA

---



- Alessi, D. R., K. Sakamoto, et al. (2006). "LKB1-dependent signaling pathways." *Annu Rev Biochem* 75: 137-63.
- Almeida, M. S. and S. J. Bray (2005). "Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead." *Mech Dev* 122(12): 1282-93.
- Amin, N., A. Khan, et al. (2009). "LKB1 regulates polarity remodeling and adherens junction formation in the *Drosophila* eye." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22): 8941-8946.
- Assemat, E., E. Bazellieres, et al. (2008). "Polarity complex proteins." *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 614-630.
- Atwood, S. X. and K. E. Prehoda (2009). "aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division." *Curr Biol* 19(9): 723-729.
- Baker, N. E. (2001). "Cell proliferation, survival, and death in the *Drosophila* eye." *Semin Cell Dev Biol* 12(6): 499-507.
- Balda, M. S. and K. Matter (2009). "Tight junctions and the regulation of gene expression." *Biochim Biophys Acta* 1788(4): 761-7.
- Baonza, A. and M. Freeman (2002). "Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling." *Development* 129(23): 5313-5322.
- Baonza, A. and M. Freeman (2005). "Control of cell proliferation in the *Drosophila* eye by Notch signaling." *Dev Cell* 8(4): 529-539.
- Baum, B. and N. Perrimon (2001). "Spatial control of the actin cytoskeleton in *Drosophila* epithelial cells." *Nat Cell Biol* 3(10): 883-890.
- Benton, R. and D. St Johnston (2003). "A conserved oligomerization domain in *drosophila*

Bazooka/Par-3 is important for apical localization and epithelial polarity." *Curr Biol* 13(15): 1330-1334.

Bergmann, A., J. Agapite, et al. (1998). "The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling." *Cell* 95(3): 331-341.

Betschinger, J., K. Mechtler, et al. (2003). "The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl." *Nature* 422(6929): 326-330.

Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* 12(1): 27-36.

Birchmeier, W. and J. Behrens (1994). "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." *Biochim Biophys Acta* 1198(1): 11-26.

Blankenship, J. T., S. T. Backovic, et al. (2006). "Multicellular rosette formation links planar cell polarity to tissue morphogenesis." *Dev Cell* 11(4): 459-70.

Bolos, V., H. Peinado, et al. (2003). "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors." *J Cell Sci* 116(Pt 3): 499-511.

Bonini, N. M. and K. W. Choi (1995). "Early decisions in *Drosophila* eye morphogenesis." *Curr. Opin. Genetics and Development* 5: 507-515.

Borysova, M. K., Y. Cui, et al. (2008). "Knockdown of B-Raf impairs spindle formation and the mitotic checkpoint in human somatic cells." *Cell Cycle* 7(18): 2894-2901.

Boutros, M., N. Paricio, et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* 94(1): 109-118.

Boutros, M., H. Agaisse, et al. (2002). "Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*." *Dev Cell* 3(5): 711-22.

Bowers-Morrow, V. M., S. O. Ali, et al. (2004). "Comparison of molecular mechanisms mediating cell contact phenomena in model developmental systems: an exploration of universality." *Biol Rev Camb Philos Soc* 79(3): 611-642.

Braga, V. M. (2002). "Cell-cell adhesion and signalling." *Curr Opin Cell Biol* 14(5): 546-556.

Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-415.

Brodsky, M. H., W. Nordstrom, et al. (2000). "*Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus." *Cell* 101(1): 103-113.

Brown, A. M., R. S. Wildin, et al. (1986). "A retrovirus vector expressing the putative mammary oncogene *int-1* causes partial transformation of a mammary epithelial cell line." *Cell* 46(7): 1001-1009.

Brown, K. E., A. Baonza, et al. (2006). "Epithelial cell adhesion in the developing *Drosophila* retina is regulated by Atonal and the EGF receptor pathway." *Dev Biol* 300(2): 710-721.

- Brumby, A. M. and H. E. Richardson (2005). "Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways." *Nat Rev Cancer* 5(8): 626-639.
- Cavey, M., M. Rauzi, et al. (2008). "A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin." *Nature* 453(7196): 751-756.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO." *Nature* 406(6798): 855-862.
- Charest, P. G. and R. A. Firtel (2007). "Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement." *Biochem J* 401(2): 377-390.
- Chen, W., M. A. White, et al. (2002). "Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway." *J Biol Chem* 277(51): 49105-49110.
- Cui, Y. and T. M. Guadagno (2008). "B-Raf(V600E) signaling deregulates the mitotic spindle checkpoint through stabilizing Mps1 levels in melanoma cells." *Oncogene* 27(22): 3122-3133.
- de Beco, S., C. Gueudry, et al. (2009). "Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(17): 7010-7015.
- Djiane, A., S. Yorgev, et al. (2005). "The apical determinants aPKC and dPatj regulate Frizzled-dependent planar cell polarity in the *Drosophila* eye." *Cell* 121(4): 621-631.
- Domínguez, M. (1999). "Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene atonal during ommatidia development." *Development* 126(11): 2345-2353.
- Dow, L. E., I. A. Elsum, et al. (2008). "Loss of human Scribble cooperates with H-Ras to promote cell invasion through deregulation of MAPK signalling." *Oncogene* 27(46): 5988-6001.
- Drees, F., S. Pokutta, et al. (2005). "Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly." *Cell* 123(5): 903-15.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102(1): 33-42.
- Ebnet, K., C. U. Schulz, et al. (2000). "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1." *J Biol Chem* 275(36): 27979-27988.
- Edwards, K. A. and D. P. Kiehart (1996). "*Drosophila* nonmuscle myosin II has multiple essential roles in imaginal disc and egg chamber morphogenesis." *Development* 122(5): 1499-511.
- Elsum, I., L. Yates, et al. "The Scribble-Dlg-Lgl polarity module in development and cancer: from flies to man." *Essays Biochem* 53: 141-168.
- Escudero, L. M., M. Bischoff, et al. (2007). "Myosin II regulates complex cellular arrangement and epithelial architecture in *Drosophila*." *Dev Cell* 13(5): 717-29.
- Escudero, L. M. and M. Freeman (2007). "Mechanism of G1 arrest in the *Drosophila* eye imaginal disc." *BMC Dev Biol* 7: 13.
- Fischer, M. G., S. Heeger, et al. (2004). "The mitotic arrest in response to hypoxia and of polar bodies during early embryogenesis requires *Drosophila* Mps1." *Curr Biol* 14(22): 2019-2024.
- Fodde, R. and T. Brabletz (2007). "Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior." *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 150-158.



- Foley, K. and L. Cooley (1998). "Apoptosis in late stage *Drosophila* nurse cells does not require genes within the H99 deficiency." *Development* 125(6): 1075-1082.
- Freeman, M. (1994). "Misexpression of the *Drosophila* *argos* gene, a secreted regulator of cell determination." *Development* 120: 2297-2304.
- Freeman, M. (1996). "Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye." *Cell* 87: 651-660.
- Fristrom, D. (1988). "The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review." *Tissue Cell* 20(5): 645-690.
- Fujita, Y., G. Krause, et al. (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." *Nat Cell Biol* 4(3): 222-231.
- Fung, Y. K., G. M. Shackleford, et al. (1985). "Nucleotide sequence and expression in vitro of cDNA derived from mRNA of int-1, a provirally activated mouse mammary oncogene." *Mol Cell Biol* 5(12): 3337-3344.
- Galko, M. J. and M. A. Krasnow (2004). "Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae." *PLoS Biol* 2(8): E239.
- García-Bellido, A. and J. R. Merriam (1971). "Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*." *Dev. Biol.* 24: 61-87.
- Gardioli, D., A. Zacchi, et al. (2006). "Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression." *Int J Cancer* 119(6): 1285-1290.
- Garrard, S. M., C. T. Capaldo, et al. (2003). "Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6." *EMBO J* 22(5): 1125-1133.
- Gavard, J., M. Lambert, et al. (2004). "Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways." *J Cell Sci* 117(Pt 2): 257-70.
- Georgiou, M., E. Marinari, et al. (2008). "Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability." *Curr Biol* 18(21): 1631-1638.
- Giannoni, E., M. Parri, et al. "EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy." *Antioxid Redox Signal* 16(11): 1248-63.
- Gilliland, W. D., S. M. Wayson, et al. (2005). "The meiotic defects of mutants in the *Drosophila* *mps1* gene reveal a critical role of Mps1 in the segregation of achiasmate homologs." *Curr Biol* 15(7): 672-677.
- Gilliland, W. D., S. E. Hughes, et al. (2007). "The multiple roles of *mps1* in *Drosophila* female meiosis." *PLoS Genet* 3(7): e113.
- Glise, B., H. Bourbon, et al. (1995). "hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement." *Cell* 83(3): 451-461.
- Goehring, N. W., C. Hoegge, et al. (2011). "PAR proteins diffuse freely across the anterior-posterior boundary in polarized *C. elegans* embryos." *J Cell Biol* 193(3): 583-594.

Golic, K. G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome." *Cell* 59: 499-509.

Goyal, L., K. McCall, et al. (2000). "Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function." *EMBO J* 19(4): 589-597.

Gumbiner, B. (1988). "Cadherins: a family of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adhesion molecules." *Trends Biochem Sci* 13(3): 75-76.

Gumbiner, B. M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(8): 622-634.

Hamaratoglu, F., M. Willecke, et al. (2006). "The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis." *Nat Cell Biol* 8(1): 27-36.

Harris, K. P. and U. Tepass (2008). "Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis." *J Cell Biol* 183(6): 1129-1143.

Harten, S. K., D. Shukla, et al. (2009). "Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin." *Mol Biol Cell* 20(3): 1089-1101.

Haruta, T., R. Warrior, et al. (2010). "The proximal half of the *Drosophila* E-cadherin extracellular region is dispensable for many cadherin-dependent events but required for ventral furrow formation." *Genes Cells*.

Heberlein, U., I. K. Hariharan, et al. (1993). "Star is required for neuronal differentiation in the *Drosophila* retina and displays dosage-sensitive interactions with Ras1." *Dev Biol* 160(1): 51-63.

Heberlein, U. and K. Moses (1995). "Mechanisms of *Drosophila* retinal morphogenesis: The virtues of being progressive." *Cell* 81: 987-990.

Hong, Y., L. Ackerman, et al. (2003). "Distinct roles of Bazooka and Stardust in the specification of *Drosophila* photoreceptor membrane architecture." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12712-12717.

Huang, J., S. Wu, et al. (2005). "The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP." *Cell* 122(3): 421-34.

Huang, Y. F., M. D. Chang, et al. (2009). "TTK/hMps1 mediates the p53-dependent post-mitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18." *Mol Cell Biol* 29(11): 2935-2944.

Hurd, T. W., S. Fan, et al. (2003). "Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia." *Curr Biol* 13(23): 2082-2090.

Hurov, J. B., J. L. Watkins, et al. (2004). "Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity." *Curr Biol* 14(8): 736-741.

Igaki, T. (2009). "Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling." *Apoptosis* 14(8): 1021-8.

- Igaki, T., R. A. Pagliarini, et al. (2006). "Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*." *Curr Biol* 16(11): 1139-1146.
- Itoh, M., H. Sasaki, et al. (2001). "Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions." *J Cell Biol* 154(3): 491-497.
- Jacinto, A., S. Woolner, et al. (2002). "Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology." *Dev Cell* 3(1): 9-19.
- Jarman, A. P., E. H. Grell, et al. (1994). "atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors." *Nature* 369: 398-400.
- Karagiosis, S. A. and D. F. Ready (2004). "Moesin contributes an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis." *Development* 131(4): 725-732.
- Knust, E. (2007). "Photoreceptor morphogenesis and retinal degeneration: lessons from *Drosophila*." *Curr Opin Neurobiol* 17(5): 541-7.
- Krahn, M. P., J. Buckers, et al. (2010). "Formation of a Bazooka-Stardust complex is essential for plasma membrane polarity in epithelia." *J Cell Biol* 190(5): 751-760.
- Krogh, B. O. and L. S. Symington (2004). "Recombination proteins in yeast." *Annu Rev Genet* 38: 233-271.
- Kurada, P. and K. White (1998). "Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression." *Cell* 95(3): 319-329.
- Kusano, K., D. M. Johnson-Schlitz, et al. (2001). "Sterility of *Drosophila* with mutations in the Bloom syndrome gene--complementation by Ku70." *Science* 291(5513): 2600-2602.
- Lampugnani, M. G., F. Orsenigo, et al. (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VE-GFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." *J Cell Biol* 174(4): 593-604.
- Langevin, J., M. J. Morgan, et al. (2005). "*Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane." *Dev Cell* 9(3): 365-376.
- LaRocque, J. R., J. M. Stark, et al. "Interhomolog recombination and loss of heterozygosity in wild-type and Bloom syndrome helicase (BLM)-deficient mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(29): 11971-11976.
- Lee, J. H., H. Koh, et al. (2006). "JNK pathway mediates apoptotic cell death induced by tumor suppressor LKB1 in *Drosophila*." *Cell Death Differ* 13(7): 1110-22.
- Lee, C. Y., K. J. Robinson, et al. (2006). "Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation." *Nature* 439(7076): 594-598.
- Lee, D. S., S. Y. Yoon, et al. "Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients." *Breast Cancer Res* 14(2): R66.
- Leibfried, A., R. Fricke, et al. (2008). "*Drosophila* Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis." *Curr Biol* 18(21): 1639-1648.
- Leng, M., D. W. Chan, et al. (2006). "MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is

important for chromosome stability.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(31): 11485-11490.

Liu, J., X. Cheng, et al. “Phosphorylation of Mps1 by BRAFV600E prevents Mps1 degradation and contributes to chromosome instability in melanoma.” *Oncogene* 32(6): 713-23.

Liu, X. and M. Winey “The MPS1 family of protein kinases.” *Annu Rev Biochem* 81: 561-585.

Lu, H. and D. Bilder (2005). “Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*.” *Nat Cell Biol* 7(12): 1232-1239.

Martin-Belmonte, F. and K. Mostov (2008). “Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis.” *Curr Opin Cell Biol* 20(2): 227-234.

Martin-Blanco, E., A. Gampel, et al. (1998). “puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*.” *Genes Dev* 12(4): 557-570.

McCaffrey, L. M. and I. G. Macara “Signaling pathways in cell polarity.” *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6).

McEwen, D. G. and M. Peifer (2005). “Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis.” *Development* 132(17): 3935-3946.

Meier, P., A. Finch, et al. (2000). “Apoptosis in development.” *Nature* 407(6805): 796-801.

Mendes, C. S., E. Arama, et al. (2006). “Cytochrome c-d regulates developmental apoptosis in the *Drosophila* retina.” *EMBO Rep* 7(9): 933-939.

Mirouse, V. and M. Billaud (2011). “The LKB1/AMPK polarity pathway.” *FEBS Lett* 585(7): 981-5.

Mirouse, V., L. L. Swick, et al. (2007). “LKB1 and AMPK maintain epithelial cell polarity under energetic stress.” *J Cell Biol* 177(3): 387-392.

Molnar, C., A. Lopez-Varea, et al. (2006). “A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing.” *Genetics* 174(3): 1635-1659.

Molnar, C. and J. F. de Celis (2006). “Independent roles of *Drosophila* Moesin in imaginal disc morphogenesis and hedgehog signalling.” *Mech Dev* 123(5): 337-51.

Muller, H. A. and E. Wieschaus (1996). “armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*.” *J Cell Biol* 134(1): 149-163.

Nakayama, M., T. M. Goto, et al. (2008). “Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation.” *Dev Cell* 14(2): 205-215.

Neisch, A. L., O. Speck, et al. “Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane.” *J Cell Biol* 189(2): 311-23.

Neubueser, D. and D. R. Hipfner (2010). “Overlapping roles of *Drosophila* Drak and Rok kinases in epithelial tissue morphogenesis.” *Mol Biol Cell* 21(16): 2869-79.

Okada, T., L. You, et al. (2007). “Shedding light on Merlin’s wizardry.” *Trends Cell Biol* 17(5): 222-229.

Page, S. L., R. J. Nielsen, et al. (2007). "A germline clone screen for meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*." *Fly* (Austin) 1(3): 172-181.

Pagliarini, R. A. and T. Xu (2003). "A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior." *Science* 302(5648): 1227-1231.

Pastor-Pareja, J. C., F. Grawe, et al. (2004). "Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade." *Dev Cell* 7(3): 387-399.

Pastor-Pareja, J. C., M. Wu, et al. (2008). "An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*." *Dis Model Mech* 1(2-3): 144-154; discussion 153.

Pellikka, M., G. Tanentzapf, et al. (2002). "Crumbs, the *Drosophila* homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis." *Nature* 416(6877): 143-149.

Perez-Garijo, A., F. A. Martin, et al. (2004). "Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*." *Development* 131(22): 5591-8.

Perez-Garijo, A., F. A. Martin, et al. (2005). "Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(49): 17664-9.

Perez-Moreno, M., C. Jamora, et al. (2003). "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions." *Cell* 112(4): 535-48.

Perrimon, N., A. Friedman, et al. (2007). "Drug-target identification in *Drosophila* cells: combining high-throughout RNAi and small-molecule screens." *Drug Discov Today* 12(1-2): 28-33.

Pilot, F., J. M. Philippe, et al. (2006). "Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz." *Nature* 442(7102): 580-584.

Pinal, N., D. C. Goberdhan, et al. (2006). "Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P3 accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells." *Curr Biol* 16(2): 140-149.

Polesello, C., I. Delon, et al. (2002). "Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis." *Nat Cell Biol* 4(10): 782-9.

Ready, D. F., T. E. Hanson, et al. (1976). "Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice." *Devl. Biol.* 53: 217-240.

Ren, B., H. Cam, et al. (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." *Genes Dev* 16(2): 245-256.

Richard, M., F. Grawe, et al. (2006). "DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye." *Dev Dyn* 235(4): 895-907.

Riesgo-Escovar, J. R., M. Jenni, et al. (1996). "The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye." *Genes Dev* 10(21): 2759-2768.

Roch, F., C. Polesello, et al. (2010). "Differential roles of PtdIns(4,5)P2 and phosphoryla-



tion in moesin activation during *Drosophila* development.” *J Cell Sci* 123(Pt 12): 2058-2067.

Roeth, J. F., J. K. Sawyer, et al. (2009). “Rab11 helps maintain apical crumbs and adherens junctions in the *Drosophila* embryonic ectoderm.” *PLoS One* 4(10): e7634.

Sahai, E. and C. J. Marshall (2002). “ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho.” *Nat Cell Biol* 4(6): 408-415.

San Filippo, J., P. Sung, et al. (2008). “Mechanism of eukaryotic homologous recombination.” *Annu Rev Biochem* 77: 229-57.

Santibanez, J. F. (2006). “JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal trans-differentiation of mouse transformed keratinocytes.” *FEBS Lett* 580(22): 5385-5391.

Sathyanarayana, P., M. K. Barthwal, et al. (2003). “*Drosophila* mixed lineage kinase/slipper, a missing biochemical link in *Drosophila* JNK signaling.” *Biochim Biophys Acta* 1640(1): 77-84.

Satoh, A. K., J. E. O'Tousa, et al. (2005). “Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors.” *Development* 132(7): 1487-1497.

Shaw, R. J., M. Henry, et al. (1998). “RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts.” *Mol Biol Cell* 9(2): 403-19.

Shewan, A. M., M. Maddugoda, et al. (2005). “Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts.” *Mol Biol Cell* 16(10): 4531-4542.

Shintani, Y., M. J. Wheelock, et al. (2006). “Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells.” *Mol Biol Cell* 17(7): 2963-2975.

Simoes, S., B. Denholm, et al. (2006). “Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis.” *Development* 133(21): 4257-67.

Sluss, H. K., Z. Han, et al. (1996). “A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*.” *Genes Dev* 10(21): 2745-2758.

Smutny, M., H. L. Cox, et al. (2010). “Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens.” *Nat Cell Biol* 12(7): 696-702.

Speck, O., S. C. Hughes, et al. (2003). “Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity.” *Nature* 421(6918): 83-7.

St Johnston, D. and J. Ahringer “Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity.” *Cell* 141(5): 757-774.

Stanyon, C. A., G. Liu, et al. (2004). “A *Drosophila* protein-interaction map centered on cell-cycle regulators.” *Genome Biol* 5(12): R96.

Strutt, D. I. (2001). “Asymmetric localization of frizzled and the establishment of cell polarity in the *Drosophila* wing.” *Mol Cell* 7(2): 367-375.

Strutt, H. and D. Strutt (2002). “Nonautonomous planar polarity patterning in *Drosophila*: dishevelled-independent functions of frizzled.” *Dev Cell* 3(6): 851-863.

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, et al. (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." *Cell* 33(1): 25-35.

Takaishi, K., T. Sasaki, et al. (1994). "Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility." *Oncogene* 9(1): 273-279.

Takekuni, K., W. Ikeda, et al. (2003). "Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse." *J Biol Chem* 278(8): 5497-5500.

Tepass, U., E. Gruszynski-DeFeo, et al. (1996). "shotgun encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia." *Genes Dev* 10(6): 672-685.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-454.

Tio, M., C. Ma, et al. (1994). "Spitz, a *Drosophila* homolog of transforming growth factor- $\alpha$ , is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets." *Mech. Dev.* 48: 13-23.

Tomlinson, A. and D. F. Ready (1987). "Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium." *Dev Biol* 120 (2): 366-376.

Tong, Z., X. D. Gao, et al. (2007). "Adjacent positioning of cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition." *J Cell Biol* 179(7): 1375-1384.

Verdier, V., C. Guang Chao, et al. (2006). "Rho-kinase regulates tissue morphogenesis via non-muscle myosin and LIM-kinase during *Drosophila* development." *BMC Dev Biol* 6: 38.

Vidal, M., S. Warner, et al. (2007). "Differing Src signaling levels have distinct outcomes in *Drosophila*." *Cancer Res* 67(21): 10278-85.

Vidal, M., L. Salavaggione, et al. "A role for the epithelial microenvironment at tumor boundaries: evidence from *Drosophila* and human squamous cell carcinomas." *Am J Pathol* 176(6): 3007-14.

Wang, S. L., C. J. Hawkins, et al. (1999). "The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID." *Cell* 98(4): 453-463.

Wei, S. Y., L. M. Escudero, et al. (2005). "Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion." *Dev Cell* 8(4): 493-504.

Wei, D. S. and Y. S. Rong (2007). "A genetic screen for DNA double-strand break repair mutations in *Drosophila*." *Genetics* 177(1): 63-77.

White, K., M. E. Grether, et al. (1994). "Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*." *Science* 264(5159): 677-683.

Wolff, T. and D. F. Ready (1991). "The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave." *Development* 113: 841-850.

Wolff, T. and D. F. Ready (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. The develop-

ment of *Drosophila melanogaster*. M. Bate and A. Martinez-Arias. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wu, M., J. C. Pastor-Pareja, et al. (2010). "Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion." *Nature* 463(7280): 545-8.

Wu, P. S., B. Egger, et al. (2008). "Asymmetric stem cell division: lessons from *Drosophila*." *Semin Cell Dev Biol* 19(3): 283-293.

Wu, H., W. Feng, et al. (2007). "PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators." *Mol Cell* 28(5): 886-898.

Xiong, Y., C. H. Huang, et al. (2010). "Cells navigate with a local-excitation, global-inhibition-biased excitable network." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(40): 17079-17086.

Xu, T. and G. M. Rubin (1993). "Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues." *Development* 117(4): 1223-1237.

Yamanaka, T., Y. Horikoshi, et al. (2001). "PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex." *Genes Cells* 6(8): 721-731.

Yamanaka, T. and S. Ohno (2008). "Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth." *Front Biosci* 13: 6693-6707.

Yonemura, S., Y. Wada, et al. (2010). "alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development." *Nat Cell Biol* 12(6): 533-42.

Yoo, S. and B. D. McKee (2004). "Overexpression of *Drosophila* Rad51 protein (DmRad51) disrupts cell cycle progression and leads to apoptosis." *Chromosoma* 113(2): 92-101.

Zeidler, M. P., C. Tan, et al. (2004). "Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins." *Nat Biotechnol* 22(7): 871-6.

Zeitlinger, J., L. Kockel, et al. (1997). "Defective dorsal closure and loss of epidermal decapentaplegic expression in *Drosophila* *fos* mutants." *EMBO J* 16(24): 7393-7401.

Zhao, L. P., C. Ji, et al. "Oxygen Glucose Deprivation (OGD)/Re-Oxygenation-Induced In Vitro Neuronal Cell Death Involves Mitochondrial Cyclophilin-D/P53 Signaling Axis." *Neurochem Res* 38(4): 705-13.